

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 06-082455

(43) Date of publication of application : 22.03.1994

(51) Int.Cl.

G01N 33/547  
C07C323/52  
C07D495/04  
G01N 21/77

(21) Application number : 05-140627

(71) Applicant : BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(22) Date of filing : 11.06.1993

(72) Inventor : GUDER HANS-JOACHIM DR  
KLEIN CHRISTIAN DR  
LILEY MARTHA DR  
SPINKE JUERGEN  
KNOLL WOLFGANG

(30) Priority

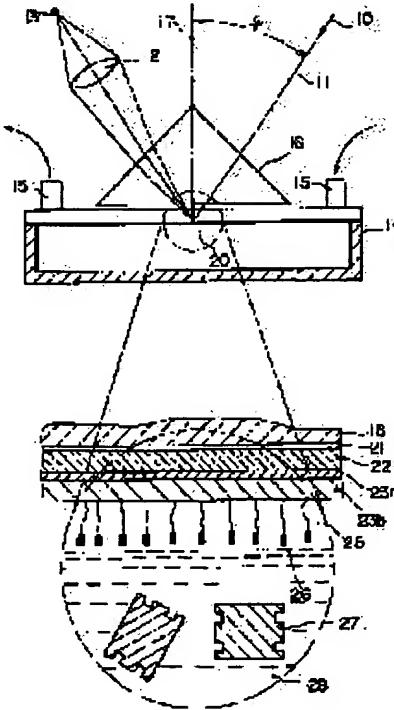
Priority number : 92 4219159 Priority date : 11.06.1992 Priority country : DE

## (54) PRODUCTION OF BINDING MATRIX, MEASUREMENT OF SPECIMEN IN SAMPLE SOLUTION, REGENERABLE LAYER AND NOVEL COMPOUND

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a binding matrix forming a binding layer dilute and laterally uniform in the content of a solid phase reactant by incubating a carrier substance along with the solid phase reactant bonded to a fixing group through a short chain spacer molecule and a water-soluble reaction soln. containing a hydrophilic diluting molecule.

**CONSTITUTION:** As an aq. reaction soln., water containing no org. solvent or an aq. buffering soln. system is used. The carrier layer 22 of a binding matrix is formed by applying a thin chromium layer 23a and a gold layer 23b to the surface of an optically transparent substance by vapor deposition and a solid phase



reactant 26 is adsorbed on the gold layer 23b by a fixing group such as thiol through a short chain spacer 25. A free reactant 27 is bondable to the solid phase reactant 26 and present in a solid phase 28. By incubating the solid phase reactant 26 and the aq. reaction soln., a dilute bonding matrix uniform in its lateral direction is formed and can be detected optically. That is, the optical thickness of each layer is measured from the reflected light of a test part 20 by a Kretschmann's apparatus and the amt. of an antibody in a specimen can be detected.

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

**[Claim(s)]**

[Claim 1] Contain a solid-phase-reaction thing by which carrier material and it were adsorbed via a fixed group and which can be combined with at least one isolation reaction component, and in that case a solid-phase-reaction thing, In a manufacturing method of a coupling matrix which mainly forms a uniform thin combining layer horizontally on the surface of carrier material, A manufacturing method of a coupling matrix incubating with an aquosity reaction solution containing a solid-phase-reaction thing and at least one hydrophilic diluent child who combined carrier material with a fixed group via a spacer molecule of a short chain.

[Claim 2] A method according to claim 1, wherein covering of a solid-phase-reaction thing on the surface of carrier material is 0.1 to 90% of all the covering which consists of a solid-phase-reaction thing and a diluent child.

[Claim 3] A method according to claim 2, wherein covering of a solid-phase-reaction thing on the surface of carrier material is 0.5 to 70% of all the covering.

[Claim 4] A method according to claim 3, wherein covering of a solid-phase-reaction thing on the surface of carrier material is 1 to 40% of all the covering.

[Claim 5] A method given [ to claims 1-4, wherein carrier material has a surface of metal or the metallic-oxide surface ] in any 1 paragraph.

[Claim 6] A method according to claim 5 which carrier material has golden -, silver -, or the palladium surface, and is characterized by a fixed group being a thiol group, a disulfide group, or a phosphine group.

[Claim 7] A method given [ to claims 1-6 using a solid-phase-reaction thing combined with a fixed group via a variable spacer molecule ] in any 1 paragraph.

[Claim 8] A method given [ to claims 1-7 using an aquosity reaction solution which does not have an organic solvent and a detergent ] in any 1 paragraph.

[Claim 9] A method given [ to claims 1-8, wherein a hydrophilic linker group exists between a

spacer molecule and a solid-phase-reaction thing ] in any 1 paragraph.

[Claim 10]A method according to claim 9, wherein a hydrophilic linker group contains one or more oxyethylene groups.

[Claim 11]A method of forming a hydrophilic linker group by amine or hydroxyl termination polyethylene oxide according to claim 10.

[Claim 12]A method according to claim 11 that a hydrophilic linker group is characterized by being formed from 1,8-diamino-3,6-dioxa octane.

[Claim 13]A method given [ to claims 1-12, wherein another spacer molecule exists between a hydrophilic linker group and a solid-phase-reaction thing ] in any 1 paragraph.

[Claim 14]A method given [ to claims 1-13, wherein a hydrophilic diluent child contains one fixed group and one spacer component ] in any 1 paragraph.

[Claim 15]A method according to claim 14, wherein a hydrophilic diluent child contains one hydrophilic linker group additionally.

[Claim 16]as a diluent child -- general formula: -- X<sup>1</sup>-S-S-X<sup>2</sup> -- or -- X<sup>1</sup> in a HS-X<sup>3</sup>[type, X<sup>2</sup>, and X<sup>3</sup> -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO-NH-L-Y, respectively, [ express and ] A method according to claim 14 or 15 which n expresses a natural number of 1-6, and L is a hydrophilic linker group which has the chain length of the atomic numbers 4-15, and is characterized by Y using a compound shown by] which is a hydrophilic end group.

[Claim 17]A method according to claim 16, wherein a hydrophilic end group is -NH<sub>2</sub>, -OH, -COOH, or -SO<sub>3</sub>H.

[Claim 18]A method given [ to claims 15-17, wherein a hydrophilic linker group contains one or more oxyethylene groups ] in any 1 paragraph.

[Claim 19]A method given [ to claims 1-18 using 2-mercaptopropionic acid [2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamide as a diluent child ] in any 1 paragraph.

[Claim 20]A method given [ to claims 1-19 being antigens or haptens which a solid-phase-reaction thing can combine with an antibody ] in any 1 paragraph.

[Claim 21]A method given [ to claims 1-19, wherein a solid-phase-reaction thing is biotin or a biotin derivative ] in any 1 paragraph.

[Claim 22]A method according to claim 21, wherein a solid-phase-reaction thing is a biotin derivative which has the small bonding affinity to streptoavidin compared with biotin.

[Claim 23]A method according to claim 21 or 22, wherein an isolation reaction component which can be combined with a solid-phase-reaction thing is streptoavidin, avidin, or its derivative.

[Claim 24]In order to build a solid-phase-reaction thing which consists of some ingredients which combined a coupling matrix acquired by a noncovalent bond after adsorption of a solid-phase-reaction thing provided with a fixed group to carrier material, A method given [ to claims

1-23 incubating with one sort or several sorts of other substances which can be combined with a coupling matrix ] in any 1 paragraph.

[Claim 25]In a method of measuring analyte in the sample solution using a specific binding reaction between at least two living thing compatibility reactants (one of them exists in solid phase unitedly, and a reaction component of another side is isolation), A measuring method of analyte in the sample solution, wherein an ingredient is the coupling matrix manufactured by any 1 \*\* to claims 1-24.

[Claim 26]A method of measuring a specific binding reaction by heat toning or mass balance optically and electronically according to claim 25.

[Claim 27]A method of measuring a specific binding reaction by catoptric light study art according to claim 25.

[Claim 28]A method of measuring a specific binding reaction by a plasmon spectroscopic analysis according to claim 27.

[Claim 29]A method of measuring a specific binding reaction with potentiometry or amperometric titration according to claim 25.

[Claim 30]A method of measuring a specific binding reaction by conductivity or a capacity variation according to claim 25.

[Claim 31]A method given [ to claims 25-30 separating an isolation reaction component which has combined a coupling matrix with a solid-phase-reaction thing after implementation of analytical measurement from a coupling matrix by addition of another isolation reactant ] in any 1 paragraph.

[Claim 32]A method according to claim 31 that another isolation reactant is characterized by having affinity higher than a solid-phase-reaction ingredient to a reaction component.

[Claim 33]A refreshable layer which uses a coupling matrix manufactured by any 1 paragraph to claims 1-24.

[Claim 34]general formula: -- X<sup>1</sup>-S-S-X<sup>2</sup> -- or -- X<sup>1</sup> in a HS-X<sup>3</sup>[type, X<sup>2</sup>, and X<sup>3</sup> -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO-NH-L-Y, respectively, [ express and ] A compound shown by] whose L n expresses a natural number of 1-6 here, and is a hydrophilic linker group which has the chain length of the atomic numbers 4-15, and whose Y is a hydrophilic end group.

[Claim 35]The compound according to claim 34, wherein a hydrophilic end group is -NH<sub>2</sub>, -OH, -COOH, or -SO<sub>3</sub>H.

[Claim 36]The compound according to claim 34 or 35, wherein a hydrophilic linker group contains one or more oxyethylene groups.

[Claim 37]2-mercaptopropionic acid [2-(2-hydroxyethoxy)]-ethylamide.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]****[0001]**

[Industrial Application] This invention contains the solid-phase-reaction thing by which carrier material and it were adsorbed via the fixed group and which can be combined with at least one isolation reaction component, and relates to the way this solid-phase-reaction thing manufactures the coupling matrix which forms a thin combining layer on the surface of a supporting material.

**[0002]**

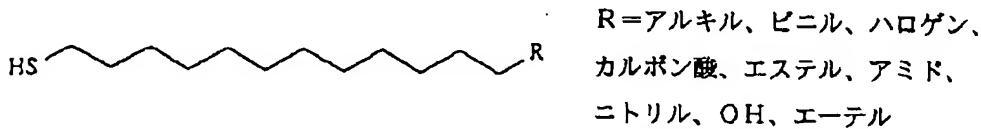
[Description of the Prior Art] The recognition reactions of a molecule are firm and a specific binding of two molecules which break out without forming share atomic union. A reaction which advances in the interface between a solid support substance and fluid environment especially is important for actual operation. For the purpose, the fixed zone containing a solid-phase-reaction thing is applied to the surface of a solid support substance. An original recognition reaction advances in this fixed zone.

[0003] One example of this fixed zone is the streptoavidin combined with polymerized albumin, and this carries out adsorption combination good to a plastic surface. This solid phase is applicable to many immunity examinations using biotin or a biotinylate reactant. This coupling matrix based on streptoavidin / polyalbumin is very preferred to a "large" plastic surface. However, if the surface covered becomes small, experimental accuracy will decrease. The necessity for miniature-izing is increasing in a new test system (for example, classic ELISA) or measurement [ optical or ] by electrochemical sensors.

[0004] bulan KEMBURUGU (Blankenburg) (Biochemistry28 (1989).) etc. In research of the 8214th page, ARERISU (Ahlers) (ThinSolid Films, the 93rd page - the 99th volume [ 180th ] (1989) page), etc., the streptoavidin monomolecular layer based on the Langmuir Blodgett (LB) film is indicated. For the purpose, a biotin lipid monomolecular layer must be manufactured

using the complicated art of film balance for the time being, and this monomolecular layer must be successively incubated with a streptoavidin solution for about 2 hours. The fault of this LB film is that the stability to that desiccation is restricted especially.

[0005]Another method of building a fixed zone on carrier material is what is called "self-assembly nature monomolecular layer (Self-assembled monolayer)" (SAM). Then, NUTTSUO (Nuzzo) and ARERA (Allara) (J. Am.Chem.Soc., the 105th volume (1983), the 4481st page - the 4483rd page) have indicated adsorption of an organic bisulfide into the gold which produces the monomolecular layer of the closest packing. Natural systematization (Spontane Organisation, therefore sign SOM) of this monomolecular layer is based on the strong specific mutual action between carrier material and an adsorbate. The vein (Bain) and white size (Whitesides) (Angew.Chem., the 101st volume (1989), the 522nd page - the 528th page) have indicated SAM generated by adsorption of a long chain thiol to a gold surface. Then, it is a formula from a thin organic solution (for example, 1 m mol/(l.)) about a gold surface. : [0006] [Formula 1]



[0007]The monomolecular layer of the closest packing is obtained by coming out and incubating with the thiol shown. This monomolecular layer is dryness and stable over several months at a room temperature in water or ethanol. If it heats in temperature of not less than 70 \*\*, desorption will break out. The stability of a monomolecular layer increases with the length of an aliphatic series chain of a thiol. This monomolecular layer is stable over a specific period (one to seven days) also to dilute acid (for example, 1N HCl) or a dilute alkali (for example, 1N NaOH).

[0008]The Europe public presentation patent No. 339821 is indicating the polymer for covering a surface of metal which contains a thiol group and an amino group as a joint medium to a solid support substance, in order to combine a suitable solid-phase-reaction thing, for example, biotin, and to combine streptoavidin subsequently to it. However, these thiol group content polymer cannot attain uniform covering strictly based on the polymer characteristic in a similar manner.

[0009]Ebersole (Ebersole) (J. Am.Chem.Soc., the 122nd volume (1990), the 3239th page - the 3241st page) is indicating functional activity adsorption of gold, the avidin by direct adsorption of these protein in the silver surface, and streptoavidin. In that case, the streptoavidin binder phase of the closest packing which produces only very insufficient covering by this joint ingredient arises in spite of the comparatively long incubation time for 20 minutes with a

biotinylate joint ingredient.

[0010]In short, about the advanced technology, the binder phase on the basis of the monomolecular layer indicated there is slow or slight covering, and it is checked that an isolation reactant can be combined. Therefore, the big necessity of removing these faults of the advanced technology selectively at least existed. The universal binder phase uniform as microscopically as possible which can combine a lot of possible fine reactants in a short time especially as much as possible should be provided.

[0011]For this reason, the coupling matrix which contains the solid-phase-reaction thing by which carrier material and it were adsorbed via the fixed group, and which can be combined with at least one isolation reaction component in the Germany patent No. 4039677 is proposed.

In that case, on the surface of carrier material, a solid-phase-reaction thing is thin and mainly forms a uniform combining layer horizontally.

The solid-phase-reaction thing may be combined with the fixed group via a spacer molecule, and it may exist between a spacer molecule and a solid-phase-reaction thing further in that case, the linker group (DADOO), for example, diaminodioxooctane, of hydrophilic nature.

[0012]Manufacture of the coupling matrix manufactured the solution of the thiol in the mixture which consists of a suitable organic solvent, for example, chloroform, alcohol, or both sides conventionally, and was performed by [ as wetting the surface of carrier material, especially gold with this solution under a suitable condition ]. However, use of the organic solvent was accompanied by the fault in great industry production. These solvents can affect the biological character of a solid-phase-reaction thing and a joint ingredient.

[0013]In the carried-out type of the Germany patent No. 4039677, in addition, although it has the fixed group other than the spacer molecule combined with the solid-phase-reaction thing, the coupling matrix containing the spacer molecule which has not been combined with a solid-phase-reaction thing is indicated. In this way, an unfilled up coupling matrix can be acquired with the optimal packed bed of the solid-phase-reaction thing for fixing an isolation reaction component, and it. One example of a suitable spacer molecule (called a diluent or a diluent child) without a solid-phase-reaction thing is mercaptoundecanol, i.e., long-chain oleophilic substances.

[0014]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]Forming the monomolecular layer in which the spacer molecule of the short chain also unexpectedly combined with the solid-phase-reaction thing is a self-assembly nature process from solution combining a hydrophilic diluent, and has the still more advantageous character as a universality coupling matrix was checked. Use of such a lipophilic component has the advantage that the problem of the solubility by the composition of a coupling matrix does not arise, when carrier material can be covered from

water or an aquosity reaction solution and a solid-phase-reaction thing has strong hydrophilic nature by this. Another advantage of aqueous solvent use is that an additional dissolution auxiliary agent (for example, detergent) does not need to exist. That is, such a dissolution auxiliary agent can bar the biological character of the uniform composition of a coupling matrix, a solid-phase-reaction thing, and a joint ingredient.

[0015]

[Means for Solving the Problem]. Therefore, an object of this invention was adsorbed by carrier material and it via a fixed group. A solid-phase-reaction thing which can be combined with at least one isolation reaction component is contained, a solid-phase-reaction thing is thin in that case, and it is a manufacturing method of a coupling matrix which mainly forms a uniform combining layer horizontally, It incubates with an aquosity reaction solution containing a solid-phase-reaction thing and at least one hydrophilic diluent child who combined carrier material with a fixed group via a spacer molecule of a short chain.

[0016]Aquosity reaction solutions are water or aqueous buffer systems fewer than especially 20% (v/v) which contain desirable organic solvents fewer than 1% (v/v) especially. An aquosity buffer system does not contain an organic solvent or an additional dissolution auxiliary agent like a detergent most desirably.

[0017]The carrier material of a coupling matrix by this invention can have the surface of metal or a metallic oxide. Especially carrier material has the precious-metals surface desirably in a surface of metal and profit. Manufacture of carrier material which has a gold surface is performed by vapor-depositing gold, for example, using chromium as an adhesion auxiliary, and an about 0.1-10-nm-thick layer produces it in that case. Gold is vapor-deposited following on this chromium layer, and a gold layer which forms the surface of carrier material of a coupling matrix by this invention in that case arises. This gold layer is about 10-100 nm in thickness advantageously, when using a coupling matrix within the limits of surface plasmon resonance. When using it, for example as electrochemical sensors in other application, a coupling matrix can also be chosen more thickly.

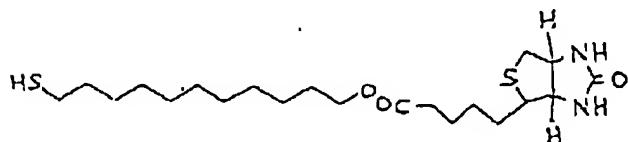
[0018]Adsorption of a solid-phase-reaction thing to the surface of carrier material is carried by a fixed group. It depends for a kind of fixed group on the surface at [ the ] every carrier material. As a fixed group of carrier material which has a surface of metal, a thiol group, a JIRUSUFIDO group, or a phosphine group is suitable. Then, especially a phosphine group is suitable for a thiol group or a JIRUSUFIDO group as a fixed group on the surface of palladium as a fixed group on gold or the surface of silver, for example. When carrier material has the metallic-oxide (for example, aluminum<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) surface, as a fixed group, a carboxylate group or a sulfonate group is suitable.

[0019]A fixed group for adsorption to solid phase is combined with a solid-phase-reaction thing via a spacer molecule, especially a variable spacer molecule of a short chain without being

directly attached to the solid-phase-reaction thing itself. as a spacer molecule of a short chain, an alkylene group shown by formula:  $(CH_2)_n$  (here -- n -- 1-6 -- especially -- 1-4 -- it is a natural number of 1-3 especially desirably) is appropriate within the limits of this invention. In side of one of these, a spacer molecule contains a suitable fixed group (for example, a thiol group or a disulfide group) for adsorption on the surface of carrier material. A spacer molecule contains one or some bond groups which a solid-phase-reaction thing or its one ingredient has combined with a spacer molecule in the another side side (that is, side which deserts carrier material). Such bond groups may be amino- or hydroxyl functional groups united under formation of a carboxyl functional group of a solid-phase-reaction thing, an ester group, or an amide group, for example. However, a spacer molecule may contain reactant amino- of a solid-phase-reaction thing or a hydroxyl functional group, and a united carboxyl functional group similarly as bond groups. In selection of a spacer molecule, short chain length is important. It is because a complex which consists of a solid-phase-reaction thing and a spacer is not fully water solubility any longer if it, that is, a hydrophobic radical are too large.

[0020]For the time being, a monomolecular layer of the closest packing by this invention of a solid-phase-reaction thing which cannot be manufactured from solution is indicated. This layer by research of the vein (Bain) and white size (Whitesides) (Angew.Chem., the 101st volume (1989), the 522nd page - the 528th page). It will be obtained if lipid which has hydroxyl or an amino terminal is made to react to an activation biotin derivative, and a biotinylate alkane thiol shown with a following formula under use of an 11-hydroxy-undecane-1-thiol as a starting material in that case generates. : [0021]

[Formula 2]

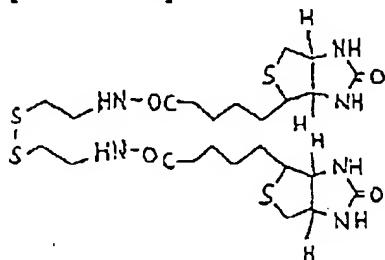


[0022]When adsorbing until this alkane thiol is saturated in the carrier material which has a gold surface, according to measurement of thickness, the monomolecular layer of the closest packing which has 100% of covering about biotin generates. In this way, the coupling matrix of the rigid body which is not based on this invention as the very thing, and has only slight associative strength to an isolation reaction component (in this case, streptoavidin) is acquired.

[0023]Manufacture of a coupling matrix according to this invention unlike this is possible by use of two or more molecules of a solid-phase-reaction thing, especially a spacer molecule united simultaneously with dyad. One example of this spacer molecule is cystamine, and this thing contains two amino functional groups as one disulfide group and bond groups as a fixed

group, therefore it can combine with dyad [ of activation biotin ], and a biotinylate compound shown with a following formula in that case generates. : [0024]

[Formula 3]



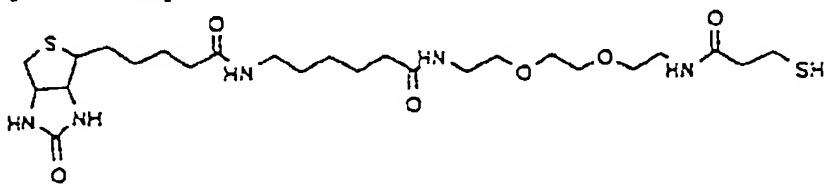
[0025]This biotinylate compound can constitute the coupling matrix by this invention which has 30% of covering degree about biotin when sticking to a gold surface, and this matrix can combine with a closest packing film the isolation reaction component (streptavidin) which has high affinity.

[0026]In particular, the linker group of hydrophilic nature exists between a spacer molecule and a solid-phase-reaction thing. This linker is a straight chain molecule which has 4-15-atom chain length especially, and especially the chain of the linker comprises a C atom and a hetero atom (especially N atom and O atom) in that case. In this case, one or especially the linker group that contains 1-5 hydrophilic ethylene oxide units especially partly is desirable. A hydrophilic linker group is especially formed of amine or hydroxyl termination polyethylene oxide desirably.

[0027]Especially between a hydrophilic linker and a solid-phase-reaction thing, another spacer molecule which consists of an alkylene group and bond groups which are shown by formula:  $(CH_2)_n$  ( $n$  is a natural number of 2-12, especially 2-8 here) is incorporable.

[0028]1,8-diamino-3,6-dioxa octane became clear as an especially suitable linker of a solid-phase-reaction thing. Then, a biotinylate compound shown with a following formula generates by incorporating 1,8-diamino-3,6-dioxa octane between a  $C_3$ -thiol spacer molecule and a biotin spacer molecule. : [0029]

[Formula 4]



[0030]The aquosity reaction solution for manufacturing a coupling matrix is provided with another hydrophilic diluent child, i.e., a fixed group, other than the above-mentioned solid-phase-reaction thing, and contains the molecule which the solid-phase-reaction thing has not combined. a suitable diluent child contains one linker group by the fixed group, the spacer

component, and a case -- that time -- C atomic number of a spacer molecule -- especially -- 1-6 -- especially -- desirable -- 1-4 -- it is 1-3 most desirably. Even in this case, in the case of selection of a spacer molecule, brief chain length is desirable. It is because a diluent child is not fully water solubility any longer if it, that is, a hydrophobic radical are too large.

[0031]Instead of a solid-phase-reaction thing, at the end especially distant from a diluent child's fixed group, a hydrophilic functional group, For example, a carboxylic amide group, a sulfonic group, or a sulfonamide group replaced by hydroxyl, a carboxylic acid group, carboxylic-acid-ethyl-ester group or methyl ester group, carboxylic amide group, one piece, two methyl groups, or an ethyl group exists. It is desirable similarly to combine a part of hydrophilic linker (based on the above-mentioned definition) or hydrophilic linker with an end distant from a diluent child's fixed group. Therefore, in one spacer molecule side, a desirable diluent child contains carrier material and a reactant fixed group, and contains a hydrophilic end group at the another side side.

[0032]A diluent child's total characteristic must be hydrophilic nature at a grade meltable to water or an aqueous buffer. Tie molecules must be able to be automatically added to carrier material. It became clear that it was necessary to have brief chain length more remarkable than the spacer/linker which has combined a diluent child with a solid-phase-reaction thing also unexpectedly. For example, a diluent child of chain length of the spacer/linker combined with a solid-phase-reaction thing smaller than 50% produces a result still better than a diluent child who has rather the chain length who is in agreement with chain length of the spacer/linker in a solid-phase-reaction thing.

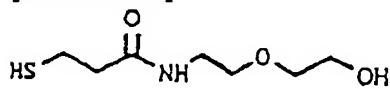
[0033]therefore, a diluent child -- especially -- general formula: $X^1-S-S-X^2$  -- or --  $X^1$  in a HS- $X^3$ [type,  $X^2$ , and  $X^3-(CH_2)_n-CO-NH-L-Y$ , respectively, [ express and ] n expresses a natural number of 1-6 here, L is a linker group of hydrophilic nature which has 4-15-atom chain length, and Y is a hydrophilic end group and a new molecular entity especially shown by] which is -NH<sub>2</sub>, -OH, -COOH, or -SO<sub>3</sub>H.

[0034]For composition of a coupling matrix by this invention, a mixture which consists of several sorts of the above-mentioned compound can also be used.

[0035]Especially one desirable example of a brief hydrophilic diluent child is 2-mercaptopropionic acid-[2-(2-hydroxyethoxy)]-ethylamide.

[0036]

[Formula 5]



[0037]In another carried-out type of this invention, the spacer which has a solid-phase-reaction

thing, and the spacer which does not have a solid-phase-reaction thing may be combined by the covalent bond. Especially when using gold or the silver surface, this combination is performed via a disulfide bridge.

[0038]a rate of a spacer molecule of having a solid-phase-reaction thing in this mixed monomolecular layer that consists of a spacer molecule which has a diluent child (spacer molecule without a solid-phase-reaction thing), and a solid-phase-reaction thing -- advantageous -- 0.1-90-mol % -- especially -- 0.5-70-mol % -- it is 1-40-mol % especially desirably.

[0039]Especially a solid-phase-reaction thing is a biotin or biotin similar molecule, for example, a desthiobiocytin, imino biotin, or HABA (4-hydroxy-phenylazobenzoic acid), and these react to streptoavidin, avidin, or its derivative similarly.

[0040]One special mode of a joint film by this invention is the method of using a biotin derivative which has remarkable small associative strength to streptoavidin like disbi OCHIN as a solid-phase-reaction thing. Since it is possible to replace combined streptoavidin by addition of a solution containing usual biotin when using these solid-phase-reaction things, a universal joint film becomes reusable in this way.

[0041]However, another suitable example of a solid-phase-reaction thing is an antigen or hapten which can be combined with an antibody. In this case, especially a solid-phase-reaction thing is hapten which has a molecular weight of 100-1200. suitable one -- steroid (for example, digoxin and digoxigenin.) Cortisol, estriol, estradiol, thio FIRIN, Diphenylhydantoin, testosterone, bile acid, progesterone, and aldosterone; short chain peptide (for example) [ ARUGIPURESHIN and ] oxytocin and bradykinin; -- fluorescein and its derivative; -- they are T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, aflatoxin, Atrazine, and phytohormone, for example, gibberellin,; and alkaloid (for example, reserpine and ajmalicine).

[0042]Biotin and a biotin derivative, digoxin, digoxigenin, fluorescein, a derivative, and theophylline are especially used as hapten desirably.

[0043]on the other hand, it may be alike, it may set, and a solid-phase-reaction thing may consist of some ingredients. It means that an inside ingredient of a solid-phase-reaction thing is combined by spacer molecule and a covalent bond, and this is not especially combined with an outside ingredient of a solid-phase-reaction thing by a covalent bond. In that case, the outside ingredient of a solid-phase-reaction thing can combine a reaction component of isolation. For example, an inside ingredient may be biotin and an outside ingredient may be streptoavidin. This coupling matrix can combine a biotinylate reaction component (for example, biotinylate antibody) from a solution similarly. It is because it, that is, streptoavidin had four binding sites to biotin and at least two of them have opened in addition.

[0044]A combining layer containing a solid-phase-reaction thing which consists of two ingredients is a coupling matrix by this invention, when an ingredient (streptoavidin when

[ Namely, ] special) which can be combined with the outside of a solid-phase-reaction thing, i.e., an isolation reaction component, forms a thin layer on the surface of a coupling matrix. [0045]A principle by this this invention of a thin unity solid-phase-reaction thing is extensible to other joint groups, for example, an antibody, an antigen, etc., etc. from combination of biotin streptoavidin.

[0046]A covering degree of a solid-phase-reaction thing in the surface of a coupling matrix can be decided by measurement of thickness of a combining layer. In that case, thickness measured decreases along with a covering degree of a combining layer.

[0047]Based on a kind from which a coupling matrix by this invention differs, a manufacturing method also differs in details. A desirable exception method of one of this manufacturing method is shown in an example. Generally, a method by this invention makes the contents an incubation of carrier material and an aquosity reaction solution in which a molecule which forms a combining layer of a coupling matrix by this invention exists. These molecules contain a fixed group and a solid-phase-reaction thing in a side which faces, and in that case, as mentioned above, no molecules of a combining layer have combined them with a solid-phase-reaction thing. In particular, a solid-phase-reaction thing is combined with a fixed group via one spacer molecule. Addition of a fixed group from a solution to carrier material is a spontaneous process under formation of a coupling matrix by this invention.

[0048]In the bottom of protection gas, especially an incubation of carrier material for the 1st combining layer manufacture and a reaction solution is performed without addition of an interfering substance like an organic solvent and a detergent in water or an aqueous buffer.

[0049]When a solid-phase-reaction thing consists of an ingredient mutually united by some noncovalent bonds especially by a case, another substance can be added by incubating with the 2nd reaction solution at the 2nd process. Since it is not criticality-like [ a reaction condition for providing another layer by the 2nd case ], it can work without protection gas.

[0050]Therefore, in order that another object of this invention may build a solid-phase-reaction thing which consists of some ingredients which have combined a coupling matrix acquired by a noncovalent bond after adsorption of a solid-phase-reaction thing provided with a fixed group to carrier material, It is the method of incubating with one which can be combined with a coupling matrix, or some another substances.

[0051]So that a combining layer of width manufactured by this invention method can be proved, for example by a surface plasmon microscopy method, It is microscopically uniform (B. Rothenhaeusler.). And W.Knoll and "Surface. Plasmon Microscopy", Nature, the 332nd volume, No. 6165, the 615th page - 617th page (1988);W.Hickel, B.Rothenhaeusler and W.Knoll, and "Surface. Plasmon Microscopic Characterisation of external surfaces", J.Appl.Phys., (1989), The 4832nd page - the 4836th page; W.Hickel, W.Knoll, and "Surface Plasmon Optical Characterisation of liquidmonolayers at 5 mum. lateral resolution",

J.Appl.Phys., the 67th volume (1990), and the 3572nd page or subsequent ones In 5-micrometer resolving, a difference of thickness cannot be measured.

[0052]This inventions are at least two living thing compatibility reactants (bioaffinen Reaktanden) (it combines with solid phase, and one of them). [ exist and ] Since an ingredient of another side quantifies analyte in the sample solution by the specific binding reaction between being isolation, it is related with a method of using a solid-phase-reaction thing which is an ingredient of a coupling matrix by this invention.

[0053]In such a method, detection of combination of an isolation reaction component in a solid-phase-reaction thing can be enabled, when an isolation reaction component has a sign group. Especially, labeling by enzyme, a fluorescence ingredient, or luminescent components is common use. Exact quantitative detection is possible for indirect optical observation of combination which becomes possible by this.

[0054]In principle, combination can be measured by heat toning change or mass formation optically and electrochemically. In electrochemical technique, it is "by OSEN cers (Biosensors)" () especially. [ Turner, Karube Wilson and (edit) ] Oxford Press publication (1987). or berg FERUDO (Bergveld) work "by OSEN cers and bioelectronics (Biosensors & Bioelectronics)" -- as [ indicate / to the 6th volume and the 55th page - the 72nd page (1991) ] - - potentiometry. And an amperometric titration (Amperometrie) method is mentioned. Measurement by conductivity or a capacity variation is possible similarly as electrochemical technique.

[0055]However, especially as for detection of combination, it is especially performed by catoptric light study art, and the thickness of a film can perform optical and a thing which have a reactant which is carrier immobilization and which is extremely observed by combination of an isolation joint ingredient with this art. Observation of such art Sadovsky. (Sadowski) : "review OBU optical MESOZU yne IMMUNO sensing (Review of optical methods in immunosensing)", SPIE, the 954th volume, and Optical. It is indicated to testing and Metrology II (1988) and the 413rd page - the 419th page.

[0056]Especially a desirable catoptric light study method is detection of combination by surface plasmon resonance (Oberflaechenplasmonenresonanz). In this method, an analysis element provides a metal conductive layer which is very small thickness and has a solid-phase-reaction thing on a transparent dielectric material. This analysis element is also often called an optical immune sensor. An example of this optical immune sensor is indicated to the Europe public presentation patent (EP-A) No. 276142, 276142, and 254575. however, a thing especially desirable to quantitative detection of combination in solid phase -- the Germany patent (DE) -- it is the immune sensor currently indicated in detail by No. 4024476.

[0057]As indicated above, a solid-phase-reaction thing which has comparatively small associative strength compared with a reaction component of isolation can be used. In this

case, it is possible for addition of another isolation reactant which has large associative strength to separate a reaction component combined with solid phase, and to reproduce a coupling matrix with it.

[0058]As opposed to a refreshable coupling matrix, a biotin derivative like TESUCHIO biotin and imino biotin can be especially used to streptoavidin desirably based on bonding affinity smaller than biotin as a solid-phase-reaction thing. (An association constant of a

desthiobiotin/streptoavidin is  $10^{12}$ , and an association constant of biotin/streptoavidin is  $10^{15}$ ).

Therefore, when using a solid-phase-reaction thing which has small affinity, since it is possible to remove united streptoavidin by addition of a solution containing a high affinity reactant (for example, biotin), a universal joint film can be repeated and used in this way.

[0059]It is advantageous under use of a refreshable desthiobiotin or an imino biotin binder phase to use a DESUCHIO biotinylate, an imino biotinylate antibody, an antibody fragment, a DESUCHIO biotinylate, or imino biotinylate (Polly) hapten for implementation of immunoassay.

[0060]Another object of this invention is the method of reproducing by separating a reaction component of isolation which combined a coupling matrix with a solid-phase-reaction thing from a coupling matrix by addition of another isolation reactant after analyte measurement implementation. As for another isolation reactant, in that case, it is advantageous to have affinity higher than a reaction component as a solid-phase-reaction thing. Examples of a suitable group which consists of a solid-phase-reaction thing and an isolation reactant are two haptens which have a desthiobiotin, biotin, or associative strength that is chemical very slightly different suitably, therefore is a little different to an antibody, for example.

[0061]Therefore, a coupling matrix manufactured by this invention can also be used as a refreshable layer.

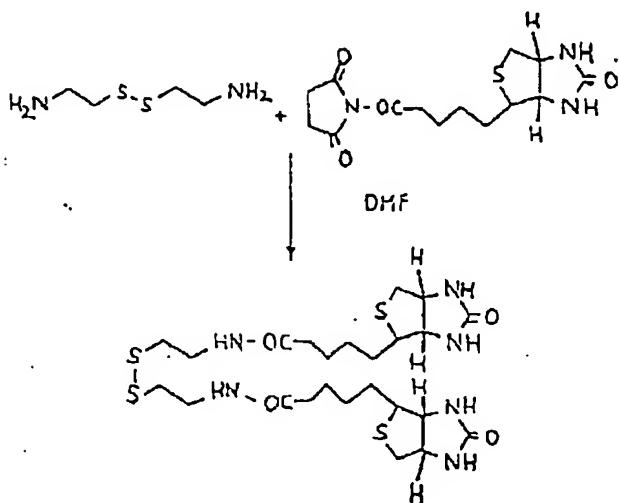
[0062]This invention is combined with drawing 1 - 3, and it clarifies according to the following example.

[0063]

[Example]

Composition of example 1 screw BIOCHI noil cystamine [0064]

[Formula 6]



[0065]Biotin N-hydroxysuccinimide ester was added to the solution of the Sister minium dichloride in dimethylformamide (DMF), and triethylamine. The reaction mixture was agitated at the night entirety room temperature. The produced sediment was separated after ending reaction, and it dried with the oil pump, and recrystallized [ acetone ]. The natural compound was obtained with the yield of 40%.

[0066]Example 2: measurement drawing 1 of the thickness of the monomolecular layer by this invention \*\*\*\*s the measuring device for measuring combination of the isolation reaction component to solid phase in catoptric light study.

[0067]It can attach into a correction KURETCHUMAN (Kretschmann) device (drawing 1), and the covered sample can be investigated to air and an aquosity medium.

[0068]This catoptric light study measuring device contains the laser 10. The primary beam of light emitted from laser enters at the angle theta to the normal of the surface of the examination portion 20. Image formation of the catoptric light is carried out on the diode 13 arranged by the condenser 12 in the image surface.

[0069]This measuring device contains the flow cuvett 14 which has the entrance and the exit 15 of the prism 16 of a KURETCHUMAN device, and a testing liquid further.

[0070]The examination portion 20 consists of the prism 16 of a KURETCHUMAN device, and the thin metal layers 23a and 23b optically vapor-deposited on the transparent dielectric carrier layer 22 and the carrier layer 22. The thin layer of the index liquid 21 combines the prism 16 without optical refraction with the transparent carrier layer 22 optically. It is because it, that is, this thin layer have the same refractive index as the parts of these both sides. In this example, 23a is the chromium layer mentioned above, and 23b is the vapor-deposited gold layer. 25 is a spacer molecule which carries combination of the solid-phase-reaction thing 26 to a gold surface via a fixed group. 27 is an isolation reaction component which a solid-phase-reaction thing and combination are possible, and exists in the solid phase 28.

[0071]The reflection in an interface can be calculated using Fresnel's formulas, a PSP spectrum can be suited in data, and "optical thickness (optischen Dicke)" (=nxd, n= refractive index, d= thickness) of each class is obtained in that case.

[0072]1,8-diamino-3,6-dioxa octane in 900 ml of the synthetic dioxane / water (1/1 v/v) of example 31-tert. butyloxy carbonyl 1,8-diamino-dioxa octane (mono-BOC-DADOO). (DADOO) The solution of 109 g (0.5 mol) of di-tert. butyl carbonate in 450 ml of dioxane is gradually added to a 142 g (1 mol) solution under churning. In addition, a mixture is agitated at 1.5 h and 20 \*\* after addition, a solvent is distilled off successingly, and a residue is taken in 1 l. of ethyl acetate / water (1/1 v/v). After separating the aqueous phase, an organic phase is extracted twice by addressing to 0.1N HCl 100ml. The aqueous phase is put together, a pH value is adjusted to pH 9-10 with rare caustic soda, and the liquid and liquid extraction of the solution are carried out in a perforator. After 750 ml of ethyl acetate extracts for 8 hours, a solvent is removed and a residue is dried in an advanced vacuum.

[0073]Yield: 32g (26%)

DC:Kieselgel. 60 eluents: Butyl acetate / water / ammonium hydroxide =30/15/15R<sub>f</sub>=0.45

example 41 -(biotin aminocaproic acid)-(1,8-diamino-4,6-dioxa octane)- Amide, 10 ml of synthetic dioxane of (biotin X-DADOO). And 0.9g (2mmol) of D-BIOCHI noil aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide ester (Boehringer Mannheim, Best Nr.1003933) in 0.1 mol (pH 8.5)/l. 10 ml of potassium phosphate buffer solution. And the solution of mono-BOC-DADOO 0.5g (2mmol) is agitated at 20 \*\* for about 2 hours. A solvent is away evaporated under vacuum after ending reaction (DC control: Kieselgel 60, eluent ethyl acetate / methanol =3/7, RF=0.6), and 1 ml of trifluoroacetic acid is added to a residue. It agitates for about 30 minutes until a BOC group \*\*\*\*s thoroughly. then -- evaporating trifluoroacetic acid in a vacuum, or adding 5 ml of ethyl acetate to a residue, and filtering out an insoluble matter -- filtrate -- evaporation -- \*\*\*\*\* .

[0074]Yield: 0.96g (98%)

DC:Kieselgel 60, eluent To 10.6 g (100mmol) of synthetic mercaptopropionic acid of ethyl acetate/methanol =2:8,R<sub>f</sub> = 0.2-example 5S-acetyl-mercaptopropionic acid. 8.6 g (110mmol) of acetyl chlorides are gradually dropped at 20 \*\*. It heats at 100 \*\* for 10 minutes after the end of addition. A reaction mixture is covered over vacuum distillation and 0.4 bar of output is purely acquired at 105 \*\*.

[0075]Yield: 5.8g (36%)

1H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): delta(ppm) =2.3 (s, 3H), 2.7 (t, 2H), 3.1 (t, 2H)

Example 6N-succinimide S-acetylthio propionate, 16.2 g (0.1mmol) of synthetic S-acetyl-mercaptopropionic acid of (SATP), 12.7g (0.11 mol) of N-hydroxysuccinimide and 22.7 g (0.11 mol) of dicyclohexylcarbodiimide are agitated at 20 \*\* in the acetic anhydride ethyl 0.4l for 16

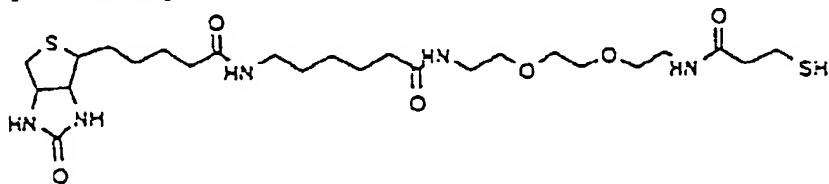
hours. A \*\* exception carries out the depositing sediment and evaporation concentration of the filtrate is carried out in a vacuum. An oily residue is taken to a little ethyl acetate, and it cools. In that case, a sediment deposits further and this is thrown away. This process is repeated twice. After carrying out evaporation concentration, SATP13g (50%) is obtained from the last filtrate.

[0076]  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ :  $\delta$ (ppm) = 2.3 (s, 3H), 2.8 (s, 4H), 2.9 (m, 2H), 3.1 (m, 2H)

Example 7 biotin aminocaproic acid-amidedioxa octyl-mercaptopropionic acid amide (compound 1)

[0077]

[Formula 7]



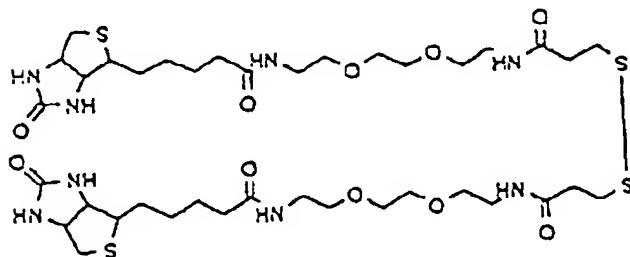
[0078] The solution which consists [ Example / 6 ] of biotin X-DADOO 0.96g (2mmol) and SATP0.5g (2mmol) from Example 4 is agitated at 20 \*\* for 2 hours in 20 ml of dioxane, and 0.1 mol (pH 8.5)/l. 20 ml of potassium phosphate buffer solution. then, a solution -- evaporation -- \*\*\*\*\* -- a residue is taken to 2 ml of trifluoroacetic acid, and it agitates at 20 \*\* under inactive gas for 0.5 hour. The flash chromatography (eluent: ethyl acetate/methanol =3:7) in silica gel performs refining.

[0079] Yield: 150 mg (13%)

DC: Kieselgel. 60, ethyl acetate/methanol =3/7  $R_f$ =0.35 example 8 biotin amide 3,6-dioxa octyl-S-acetyl-mercaptopropionic acid amide, 0.1 mol/l. of synthetic potassium phosphate buffer solution of (biotin DADOO-SATP). (pH 7.0) The solution set to biotin DADOO 1g (2.7mmol) melted in 40 ml from SATP(from Example 6) 1.4g (5.35mmol) in 40 ml of dioxane is added gradually. 0.1 mol/l. of potassium phosphate buffer solution must adjust a pH value to pH7.0 continuously during addition. agitating in addition after the end of addition for 10 minutes -- succeedingly -- evaporation -- \*\*\*\*\* . Rough output can be used in the following process, without refining further.

[0080] DC: Kieselgel 60, eluent Composition of ethyl acetate/methanol =3.5/7.5  $R_f$ = 0.35- example 9 bis-(biotin amide 3,6-dioxa acetyl)-mercaptopropionic acid amide disulfide (compound 2) [0081]

[Formula 8]



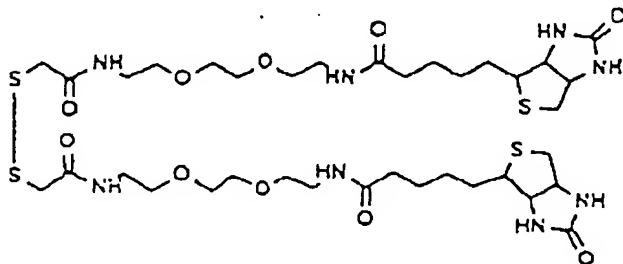
[0082]The rough output 1.6g from Example 8 is melted in 0.5 mol (pH 7.5)/l. 100 ml of potassium phosphate buffer solution of nitrogen saturation, and 5.4 ml is added a 1 mol/l. methanolic hydroxylamine solution. agitating at 20 \*\* for 2 hours -- succeedingly -- the inside of a vacuum -- evaporation -- \*\*\*\*\* -- the flash chromatography (ethyl acetate/methanol =3/7) in silica gel refines.

[0083]Yield: 150 mg (6%)

DC:Kieselgel 60, eluent Synthetic manufacture of ethyl acetate/methanol =3/7 $R_f$ =0.35 example 10 biotin amide 3,6-dioxa octyl-S-acetylmercaptoacetic acid amide and (biotin DADOO-SATA), It carries out to example 8 resemblance from 187 mg (0.8mmol) of N-succinimidyl S-acetyl-thio acetate (SATA) (Boehringer, Best Nr.1081765), and biotin DADOO 300mg (0.8mmol).

[0084]Yield: 109 mg (49%)

DC:Kieselgel 60, eluent Composition of ethyl acetate/methanol =6.5/3.5 $R_f$ = 0.35-example 11 bis-(biotin amide 3,6-dioxa acetyl)-mercaptoacetic acid amide disulfide (compound 3) [0085] [Formula 9]



[0086]Manufacture is performed to example 9 resemblance from 0.25 ml biotin DADOO-SATA 100mg (0.2mmol) and a 1 mol/l. methanolic hydroxylamine solution.

[0087]Yield: 55 mg (60%)

DC:Kieselgel 60 and eluent . ethyl acetate/methanol =3/7 $R_f$ = -- Two in 0.35-example 12a 2-(S-acetyl) mercaptopropionic acid-[2-(2-hydroxyethoxy)]-ethylamide THF25ml -(2-aminoethoxy)- 2.14g of ethanol. In the solution which consists of (20mmol), within 15 minutes, the solution which consists of 5g (20mmol) of N-succinimidyl S-acetylthio propionate (SATP, Example 2c) in THF50ml is dropped, and it agitates at 20 \*\* for 2 hours. Evaporation concentration of the reaction mixture is carried out in a vacuum after the conclusion of a reaction (DC control), and it applies to the chromatography in silica gel (Kieselgel 60, eluent ethyl acetate / methanol =7 /

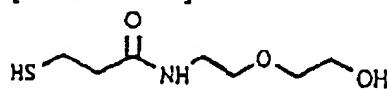
3+1% acetic acid).

DC : (Kieselgel 60, eluent ethyl acetate / methanol =7 / 3+1% acetic acid)

$R_f=0.67$  yield: 2.7gMS(pos FAB): $MH^+=236$ b 2-mercaptopropionic acid-[2-(2-hydroxyethoxy)]-ethylamide (compound 4)

[0088]

[Formula 10]



[0089] 600 ml was added to the compound a2.7g (8.7mmol) the 1 mol/l. hydroxylamine solution in methanol, and it agitated at 20 \*\* for 1 hour. Then, the solvent was distilled off in the vacuum and dichloromethane extracted the residue 3 times. The oily rough output 1.5g was acquired and the flash chromatography in silica gel refined this (Kieselgel 60, eluent dichloromethane / methanol =9.3/0.7).

DC : (Kieselgel 60, eluent dichloromethane / methanol =9/1)

$R_f=0.45$  yield: 0.86 (colorless oily matter)

MS(pos FAB): $MH^+=194$  example 13a sample preparation: The golden board was manufactured by vapor-depositing Au(99.99%) about 5 nm to the slide glass (Berliner GlasKG) which consists of LASFN9.

[0090] Vacuum evaporation was performed in the evaporation apparatus BAE250 of Balzers, and it carried out with pressure  $<=5\times10^{-6}$  m bar.

[0091] b) Monomolecular layer formation : the golden board was put in the 0.5-m molar solution of the compound in water (MilliQ) under argon protection gas immediately after opening an evaporation apparatus. After 6-h adsorption time, 300 ml of water washed the substrate and it dried in the nitrogen air current.

[0092] c) Characteristic determination : a characteristic decision of the monomolecular layer was made using the surface plasmon spectroscopic analysis and the angle-of-contact measuring method.

[0093] Surface plasmon spectroscopic analyses are optical means which have the high sensitivity for [ of the surface and a thin film ] making a characteristic decision, and do not need a special molecule sign (for example, fluorescent labeling), either (W. Knoll, MRS Bulletin, the 16th volume, No.7 (1991) the 29th page - the 39th page).

[0094] For measurement of the thickness of a self-assembly nature monomolecular layer (SAM), measurement to air and an aquosity medium was carried out.

[0095] Angle-of-contact measurement is a method often used in order to analyze an interface.

In that case, the kind of a substrate and tunic, a presentation, and the information about the order on a film can be acquired (A. Ullmann, "Introduction to ultrathin organic films", Academic Press, Inc. 1991). For measurement of an angle of contact, the angle-of-contact microscope G1 (Kruess/Hamburg) was used. All the written values from the 1st table and the 2nd table are average value from at least six measurement in a different part on a carrier. In that case, an error is \*\*2 degrees.

[0096]In the next experiment, the wettability of water refined with the ultrafiltration (Milli Q) on each film was measured.

[0097]

[Table 1]

第1表：

測定結果：測定された層厚および接触角

	SAMの厚さ d [Å]				
	d 検定値 <sup>1</sup>	d 計算値 <sup>2</sup> (垂直)	d 計算値 <sup>2</sup> (30° 傾斜)	n <sup>4</sup>	θ a <sup>3</sup> [°]
化合物4（水から）	9 ± 2	1 3	1 1	1.5 0	2 6 ± 2
化合物1（水から）	3 3 ± 2	3 8	3 3	1.5 0	3 5 ± 2
化合物1（緩衝液から）	3 3 ± 2	3 8	3 3	1.5 0	

<sup>1</sup>リン酸塩緩衝液0.05モル／l、pH 7.0

<sup>2</sup>SAMの厚さは結合の長さから計算

<sup>3</sup>θ a[°]は、A. Ullmann、"Introduction to ultrathin Organic films"、Academic Press, Inc. 1991年により測定

<sup>4</sup>屈折率nはUllmann、supraによる

[0098]The measured thickness is well in agreement with the value calculated theoretically. This aligns, respectively and directs that it is the monomolecular layer with which it filled up densely. In that case, a molecule -- white size (Whitesides) (C. -- D.Bain, G.M.Whitesides, and Science 240 (1988) the 62 -- page;KL.Prime and G.M.Whitesides -- Science.) etc. 252 (1991) -- in the data and resemblance which were announced by the 1164th page, about 30 degrees may incline to a surface normal about a long chain alkane thiol similarly.

[0099]An angle of contact is also well in agreement with the value obtained from OH on the polycrystal nature Au, or a biotin termination alkane thiol (H. Wolf, Diplomarbeit Universitaet Mainz 1991). An angle of contact aligns and supports the image of the monomolecular layer with which it filled up densely.

[0100]In order to investigate the associative strength of streptoavidin (SA) of these new

compounds, the mixture with the compound 4 was also investigated besides the pure compound 1. Similarly, the protein layer was further accumulated by the biotinylate Fab fragment (Fab<HCG>) of a monoclonal antibody and the adsorption of HCG to HCG.

[0101]adding streptoavidin and Fab as a  $5 \times 10^{-7}$  mol / an I solution -- HCG (Homo sapiens choriogonadotropin) -- NaCl 0.5 mol/l. -- it added as an inner 25 microg [/ml ] solution.

[0102]

[Table 2]

第2表 :

測定された接触角  $\theta_a$  および層厚 d [Å]

X b <sup>1</sup>	$\theta_a^{\circ}$ <sup>2</sup>	d(SAM) <sup>3</sup>	d(SA) <sup>3, 7</sup>	d(B-Fab) <sup>4, 7</sup>	d(HCG) <sup>7</sup>	d(RSA) <sup>5, 7</sup>
0	$26 \pm 2$	9	0	0		0
0. 1	$37 \pm 2$	10	40	31	16	
0. 25	$40 \pm 2$	20	41	26	14	
0. 50	$39 \pm 2$	24	36	23	12	
0. 75	$39 \pm 2$	28	31	10	4	
1. 00	$35 \pm 2$	33	23	7	5	

<sup>1</sup>化合物 1 のモル分率

<sup>2</sup>  $\theta_a^{\circ}$  はUllmann、supraにより測定

<sup>3</sup> SA = ストレプトアビシン

<sup>4</sup> B - F ab = ビオチニル化Fab<HCG>

<sup>5</sup> 化合物 1 および 4 による金表面の被覆が不十分な場合、ウシの血清アルブミン (RSA)

添加によって、金表面の露呈個所におけるタンパク質の吸着、ひいては層厚増加を行わねばならない。

<sup>6</sup> 膜の屈折率 : n = 1. 50 (Ullmann、supra)

<sup>7</sup> 膜の屈折率 : n = 1. 45 (H.Morgan, D.M.Taylor, C.D' Silva, Thin Solid Films, 第209巻 (1992年) 第122頁)。

[0103]The increase in thickness d (SAM) of a thiol monomolecular layer is corrected with the value from the 1st table.

[0104]Optimization of streptoavidin associative strength is attained by diluting the compound 1 in a gold surface with the compound 4.

[0105]The thickness measured when covering of the surface by streptoavidin was perfect is 40A,. Therefore, are well in agreement with the value expected theoretically. R. -- C.Ebersole, M.D.Word, J.A.Miller, J.R.Moran, J.Am.Chem.Soc., 3239th volume [ 112nd ] (1990) page - the 3241 -- page-.C.Weber and D.H., [ Ohlendorf and ] J.J. Wendoloski, F.R.Salemme, Science,

the 242nd volume (1989), the 85th page.

[0106]This optimization streptoavidin layer can be committed as an optimum-coupling phase to B-Fab<HCG>, and this layer can be similarly used for HCG detection.

[0107]It is combinable with having indicated for the example 7 of manufacture of the coupling matrix reproduced example 14 similar at SATP by making a desthiobiotin and imino biotin into desthiobiotin X-DADOO and imino biotin X-DADOO.

[0108]These compounds can be used as a coupling matrix, when a binder phase should be refreshable.

[0109]For reproduction, solid phase is incubated at a room temperature with the solution of the biotin  $2 \times 10^{-4}$  mol / l for 10 minutes and in NaCl 0.5 Mol / l. Then, it washes twice by NaCl 0.5 mol/l.

[0110]Reproduction of a binder phase is performed not less than (it measures by surface plasmon resonance) 90%.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

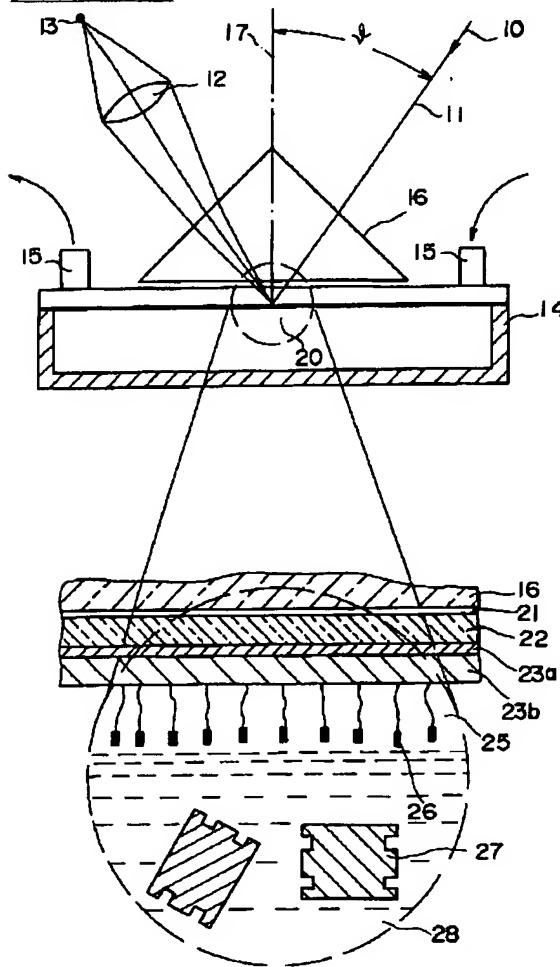
JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

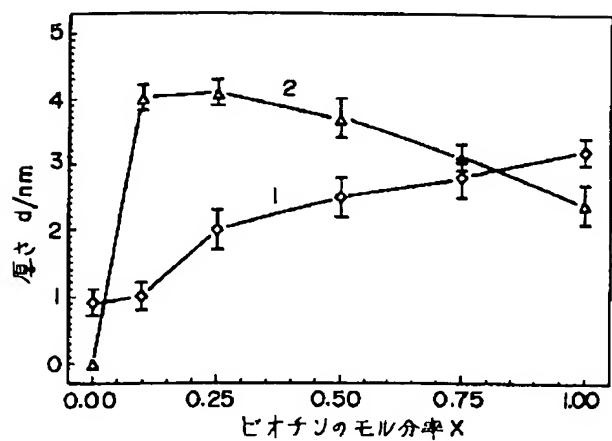
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DRAWINGS**

---

**[Drawing 1]****[Drawing 2]**



---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-82455

(43)公開日 平成6年(1994)3月22日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 01 N 33/547		9015-2J		
C 07 C 323/52		7419-4H		
C 07 D 495/04	103	9165-4C		
G 01 N 21/77		B 7906-2J		

審査請求 有 請求項の数37(全 14 頁)

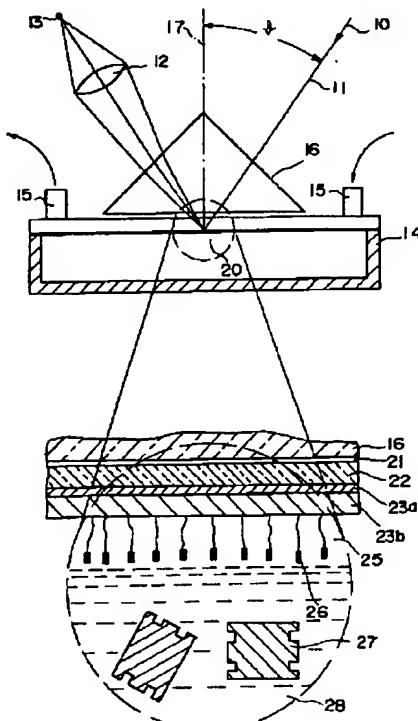
(21)出願番号	特願平5-140627	(71)出願人	390009450 ベーリンガー マンハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
(22)出願日	平成5年(1993)6月11日	(72)発明者	BOEHRINGER MANNHEIM GESELLSCHAFT MIT BESCHRANKTER HAFTUNG ドイツ連邦共和国 マンハイム 31 ザントホーフエルストラーゼ 116
(31)優先権主張番号	P 4 2 1 9 1 5 9. 9	(73)代理人	ハンス-ヨアヒム グーダー ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム シュヴァトアッハヴェーク 1
(32)優先日	1992年6月11日	(74)代理人	弁理士 矢野 敏雄 (外2名)
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 結合マトリックスの製造方法、試料溶液中の被検体の測定方法、再生可能な層および新規化合物

(57)【要約】

【目的】 担体物質およびそれに固定基を介して吸着された固相反応物を含有し、固相反応物が担体物質の表面上に希薄で主として横に均一な結合層を形成する結合マトリックスを、妨害有機溶剤および洗剤を使用せずに製造する。

【構成】 担体物質を、短鎖スペーサ分子を介して固定基と結合した固相反応物および少なくとも1つの親水性希釈分子を含有する水性反応溶液と共にインキュベートする。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 担体物質およびそれに固定基を介して吸着された、少なくとも1つの遊離反応成分と結合しうる固相反応物を含有し、その際固相反応物は、担体物質の表面上に、主として横に均一な希薄な結合層を形成する、結合マトリックスの製造方法において、担体物質を、短鎖のスペーサ分子を介して固定基と結合した固相反応物および少なくとも1つの親水性希釈分子を含有する水性反応溶液と共にインキュベートすることを特徴とする結合マトリックスの製造方法。

【請求項2】 担体物質の表面上の固相反応物の被覆が、固相反応物および希釈分子からなる全被覆の0.1～90%であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 担体物質の表面上の固相反応物の被覆が全被覆の0.5～70%であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項4】 担体物質の表面上の固相反応物の被覆が全被覆の1～40%であることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】 担体物質が金属表面または金属酸化物表面を有することを特徴とする請求項1から4までのいずれか1項記載の方法。

【請求項6】 担体物質が金、銀またはパラジウム表面を有し、固定基がチオール基、ジスルフィド基またはホスフィン基であることを特徴とする請求項5記載の方法。

【請求項7】 可変スペーサ分子を介して固定基と結合している固相反応物を使用することを特徴とする請求項1から6までのいずれか1項記載の方法。

【請求項8】 有機溶剤および洗剤を有しない水性反応溶液を使用することを特徴とする請求項1から7までのいずれか1項記載の方法。

【請求項9】 スペーサ分子と固相反応物の間に親水性リンカー基が存在することを特徴とする請求項1から8までのいずれか1項記載の方法。

【請求項10】 親水性リンカー基が1以上のオキシエチレン基を含有することを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】 親水性リンカー基をアミーまたはヒドロキシル成端ポリエチレンオキシドによって形成することを特徴とする請求項10記載の方法。

【請求項12】 親水性リンカー基が、1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタンから形成されていることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】 親水性リンカー基と固相反応物の間にもう1つのスペーサ分子が存在することを特徴とする請求項1から12までのいずれか1項記載の方法。

【請求項14】 親水性希釈分子が1個の固定基および1個のスペーサ成分を含有することを特徴とする請求項1から13までのいずれか1項記載の方法。

【請求項15】 親水性希釈分子が付加的に1つの親水性リンカー基を含有することを特徴とする請求項14記載の方法。

【請求項16】 希釈分子として一般式：  
 $X^1 - S - S - X^2$  または  $H S - X^3$

[式中  $X^1$ ,  $X^2$  および  $X^3$  はそれぞれ  $-(CH_2)_n-CO-NH-L-Y$  を表わし、 $n$  は1～6の自然数を表わし、 $L$  は原子数4～15の鎖長を有する親水性リンカー基であり、 $Y$  は親水性末端基である] で示される化合物を使用することを特徴とする請求項14または15記載の方法。

【請求項17】 親水性末端基が  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-COOH$  または  $-SO_3H$  であることを特徴とする請求項16記載の方法。

【請求項18】 親水性リンカー基が1以上のオキシエチレン基を含有することを特徴とする請求項15から17までのいずれか1項記載の方法。

【請求項19】 2-メルカプトプロピオン酸 [2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミド] を希釈分子として使用することを特徴とする請求項1から18までのいずれか1項記載の方法。

【請求項20】 固相反応物が抗体と結合しうる抗原またはハプテンであることを特徴とする請求項1から19までのいずれか1項記載の方法。

【請求項21】 固相反応物がビオチンまたはビオチン誘導体であることを特徴とする請求項1から19までのいずれか1項記載の方法。

【請求項22】 固相反応物がビオチンに比べて小さい、ストレプトアビシンへの結合親和力を有するビオチン誘導体であることを特徴とする請求項21記載の方法。

【請求項23】 固相反応物と結合しうる遊離反応成分がストレプトアビシン、アビシンまたはその誘導体であることを特徴とする請求項21または22記載の方法。

【請求項24】 担体物質への固定基を備える固相反応物の吸着後、得られる結合マトリックスを、非共有結合で結合した幾つかの成分からなる固相反応物をつくるために、結合マトリックスと結合しうる他の1種または数種の物質と共にインキュベートすることを特徴とする請求項1から23までのいずれか1項記載の方法。

【請求項25】 少なくとも2つの生物親和性反応物(そのうちの1つは固相に結合して存在し、他方の反応成分は遊離である)の間の特異的結合反応を用いて試料溶液中の被検体を測定する方法において、成分が、請求項1から24までのいずれか1つにより製造された結合マトリックスであることを特徴とする試料溶液中の被検体の測定方法。

【請求項26】 特異的結合反応を光学的、電子的に実熱量または質量収支により測定することを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項27】 特異的結合反応を反射光学的技術によって測定することを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項28】 特異的結合反応をプラズモン分光分析で測定することを特徴とする請求項27記載の方法。

【請求項29】 特異的結合反応を電位差測定または電流滴定で測定することを特徴とする請求項25記載の方法。

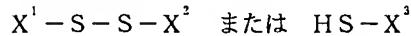
【請求項30】 特異的結合反応を導電率または容量変化により測定することを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項31】 結合マトリックスを分析測定の実施後、固相反応物に結合している遊離反応成分を別の遊離反応物の添加によって結合マトリックスから分離することを特徴とする請求項25から30までのいずれか1項記載の方法。

【請求項32】 別の遊離反応物が、反応成分に対し、固相反応成分よりも高い親和力を有することを特徴とする請求項31記載の方法。

【請求項33】 請求項1から24までのいずれか1項により製造した結合マトリックスを使用する再生可能な層。

【請求項34】 一般式：



[式中  $X^1$ ,  $X^2$  および  $X^3$  はそれぞれ  $- (CH_2)_n - C$   $O - NH - L - Y$  を表わし、ここで  $n$  は 1 ~ 6 の自然数を表わし、L は原子数 4 ~ 15 の鎖長を有する親水性リンカー基であり、Y は親水性末端基である] で示される化合物。

【請求項35】 親水性末端基が  $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-COOH$  または  $-SO_3H$  であることを特徴とする請求項34記載の化合物。

【請求項36】 親水性リンカー基が 1 以上のオキシエチレン基を含有することを特徴とする請求項34または35記載の化合物。

【請求項37】 2-メルカプトプロピオン酸 [2-(2-ヒドロキシエトキシ)]-エチルアミド。

【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、担体物質およびそれに固定基を介して吸着された、少なくとも 1 つの遊離反応成分と結合しうる固相反応物を含有し、この固相反応物が担体材料の表面上に希薄結合層を形成する結合マトリックスを製造する方法に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】 分子の認識反応とは共有原子結合を形成することなしに起きる 2 つの分子の強固かつ特異的結合

である。実際の操作には、殊に固体担体物質と流体環境との間の境界面において進行するような反応が重要である。このためには固体担体物質の表面に、固相反応物を含有する固定層が塗布される。この固定層において本来の認識反応が進行する。

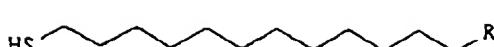
【0003】かかる固定層の 1 例は重合アルブミンに結合したストレプトアビジンであり、これがプラスチック表面に良好に吸着結合する。この固相は、ビオチンないしはビオチニル化反応物を用い多数の免疫試験に使用することができる。ストレプトアビジン/ポリアルブミンに基づくこの結合マトリックスは、“大きい” プラスチック表面に対し極めて好適である。しかし、被覆される表面が小さくなると、試験の精度が減少する。新しい試験系（たとえば古典的ELISA）または光学的または電気化学的センサによる測定においては、ミニチュア化の必要性が増加している。

【0004】プランケンブルグ (Blankenburg) 等 (Biochemistry 28 (1989 年)、第 8214 頁) およびアーレリス (Ahlers) 等 (Thin Solid Films, 第 180 卷 (1989 年) 第 93 頁～第 99 頁) の研究には、ラングミュア・プロジェクト (LB) 膜に基づくストレプトアビジン単分子層が記載される。このためには、差当りビオチンリピド単分子層をフィルムバランスの複雑な技術を用いて製造し、引き続き該単分子層をストレプトアビジン溶液と共に約 2 時間インキュベートしなければならない。さらに、この LB 膜の欠点は、殊にその乾燥に対する安定性が制限されていることである。

【0005】担体物質上に固定層をつくるもう 1 つの方法は、いわゆる “自己集合性単分子層 (Self-assembled monolayer)” (SAM) である。それで、ヌツツオ (Nuzzo) およびアーラ (Allara) (J. Am. Chem. Soc., 第 105 卷 (1983 年)、第 4481 頁～第 4483 頁) は最密充填の単分子層を生じる、金への有機二硫化物の吸着を記載している。かかる単分子層の自然組織化 (Spontane Organisation、従つて記号 SOM) は、担体物質と吸着質との間の強い特異的相互作用に基づく。ベイン (Bain) およびホワイトサイズ (Whitesides) (Angew. Chem., 第 101 卷 (1989 年)、第 522 頁～第 528 頁) は、金表面に長鎖チオールの吸着によって生成する SAM を記載している。それで、金表面を希薄有機溶液（たとえば 1 m モル/1）からの式：

#### 【0006】

#### 【化 1】



R=アルキル、ビニル、ハロゲン、  
カルボン酸、エステル、アミド、  
ニトリル、OH、エーテル

【0007】で示されるチオールと共にインキュベートすることによって最密充填の単分子層が得られる。この単分子層は、乾燥状態で、水またはエタノール中で室温で数ヶ月にわたって安定である。70℃以上の温度に加熱すると、脱着が起きる。単分子層の安定性は、チオールの脂肪族連鎖の長さと共に増加する。希酸（たとえば1N HCl）または希アルカリ（たとえば1N NaOH）に対しても、この単分子層は特定期間（1～7日）にわたって安定である。

【0008】ヨーロッパ公開特許第339821号は、適当な固相反応物、たとえばビオチンを結合し、次いでそれにストレプトアビシンを結合するために、固体担体物質に対する結合媒体としてチオール基およびアミノ基を含有する、金属表面を被覆するためのポリマーを開示している。しかし、これらのチオール基含有ポリマーは、同様にそのポリマー特性に基づき厳密に均一な被覆を達成できない。

【0009】エバーソール (Ebersole) 等 (J. Am. Chem. Soc., 第122巻(1990年)、第3239頁～第3241頁) は、金および銀の表面でのこれらタンパク質の直接吸着によるアビシンおよびストレプトアビシンの機能活性吸着を開示している。その際、ビオチニル化結合成分との20分の比較的長いインキュベーション時間にも拘らず、この結合成分による非常に不十分な被覆しか生じない最密充填のストレプトアビシン結合相が生じる。

【0010】要するに、先行技術については、そこに記載された単分子層を基礎とする結合相は、緩慢にまたは僅かな被覆で、遊離反応物を結合しうるにすぎないことが確認される。従って、先行技術のこれらの欠点を少なくとも部分的に除去する大きな必要性が存在した。殊に、できるだけ短時間にできるだけ大量の細かい反応物を結合することのできる、できるだけ微視的に均一な普遍結合相を提供すべきである。

【0011】このために、ドイツ国特許第4039677号には、担体物質およびそれに固定基を介して吸着された、少なくとも1つの遊離反応成分と結合しうる固相反応物を含有する結合マトリックスが提案されており、その際固相反応物は担体物質の表面上に、希薄で主として横に均一な結合層を形成する。固相反応物は、スペーサ分子を介して固定基と結合していてもよく、その際さらにスペーサ分子と固相反応物との間には親水性のリンカ基、たとえばジアミノジオキソオクタン (DADO O) が存在しうる。

【0012】結合マトリックスの製造は従来、適當な有機溶剤、たとえばクロロホルム、アルコールまたは双方からなる混合物中のチオールの溶液を製造し、担体物質、とくに金の表面を適當な条件下に該溶液で濡らすようにして行なわれた。しかし、有機溶剤の使用は、大工業的生産においては欠点を伴なっていた。さらに、これらの溶剤は固相反応物および結合成分の生物学的性質に影響を及ぼしうる。

【0013】ドイツ国特許第4039677号の実施形においては、固相反応物と結合しているスペーサ分子のほかにお、固定基を備えているが、固相反応物と結合していないスペーサ分子を含有する結合マトリックスが開示されている。こうして、遊離反応成分を固定するための固相反応物の最適充填層、それと共に非充填結合マトリックスを得ることができる。固相反応物なしの適當なスペーサ分子（希釈剤または希釈分子と呼ばれる）の1例は、メルカプトウシデカノール、つまり長鎖の親油性物質である。

【0014】【発明が解決しようとする課題】意外にも、固相反応物と結合した短鎖のスペーサ分子は、親水性希釈剤と組合せて水溶液から自己集合性プロセスで、普遍性結合マトリックスとしてなお有利な性質を有する単分子層を形成することが確認された。このような親油性成分の使用は、担体物質の被覆を水または水性反応溶液から行なうことができ、これによって固相反応物が強い親水性を有する場合、結合マトリックスの構成による溶解度の問題が生じないという利点を有する。水性溶媒使用のもう1つの利点は、付加的溶解助剤（たとえば洗剤）が存在する必要がないことである。即ち、このような溶解助剤は、結合マトリックスの均一な構成ならびに固相反応物および結合成分の生物学的性質を妨げうる。

【0015】【課題を解決するための手段】従って、本発明の対象は、担体物質およびそれに固定基を介して吸着された、少なくとも1つの遊離反応成分と結合しうる固相反応物を含有し、その際固相反応物は希薄で主として横に均一な結合層を形成する結合マトリックスの製造方法であり、担体物質を、短鎖のスペーサ分子を介して固定基と結合した固相反応物および少なくとも1つの親水性希釈分子を含有する水性反応溶液とインキュベートすることを特徴とする。

【0016】水性反応溶液は、とくに20% (v/v) よりも少ない、とくに望ましくは1% (v/v) よりも

少ない有機溶剤を含有する水または水性緩衝液系である。水性緩衝液系は最も望ましくは、有機溶剤または洗剤のような付加的溶解助剤を含有していない。

【0017】本発明による結合マトリックスの担体物質は、金属または金属酸化物の表面を有することができる。とくに、担体物質は金属表面、とくに望ましくは貴金属表面を有する。金表面を有する担体物質の製造は、たとえば付着助剤としてクロムを用いて金を蒸着することによって行なわれ、その際約0.1~10nmの厚さの層が生じる。このクロム層に引き続き金を蒸着することによって行なわれ、その際約0.1~10nmの厚さの層が生じる。この金層は、結合マトリックスを表面プラズモン共鳴の範囲内で使用する場合には、有利に約10~100nmの厚さである。他の適用の場合、たとえば電気化学的センサとして使用する場合には、結合マトリックスはより厚く選択することもできる。

【0018】担体物質の表面への固相反応物の吸着は、固定基によって媒介される。固定基の種類は、担体物質のそのつどの表面に依存する。金属表面を有する担体物質の固定基としては、チオール基、ジルスフィド基またはホスフィン基が適当である。それで、たとえばチオール基またはジルスフィド基は金または銀表面の固定基としてかつホスフィン基はパラジウム表面の固定基としてとくに適当である。担体物質が金属酸化物（たとえばAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>）表面を有する場合、固定基としてはカルボキシレート基またはスルホネート基が適当である。

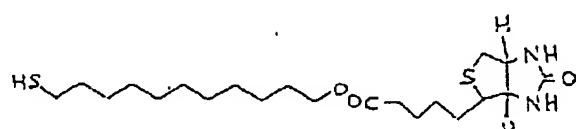
【0019】固相に対する吸着のための固定基は直接に固相反応物自体に取付けられていないで、短鎖のスペーサ分子、とくに可変スペーサ分子を介して固相反応物と結合している。短鎖のスペーサ分子としては、本発明の\*

\*範囲内では式：(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>（ここでnは1~6、とくに1~4、殊に望ましくは1~3の自然数である）で示されるアルキレン基が妥当である。スペーサ分子はその一方の側に、担体物質の表面への吸着に適当な固定基（たとえばチオール基またはジルスフィド基）を含有する。スペーサ分子は、その他方の側（つまり担体物質から離反する側）に、固相反応物またはその1成分がスペーサ分子と結合している1つまたは幾つかの結合基を含有する。これらの結合基は、たとえば固相反応物のカルボキシル官能基とエステル基またはアミド基の形成下に結合しているアミノーまたはヒドロキシル官能基であってもよい。しかし、スペーサ分子は結合基として、同様に固相反応物の反応性アミノーまたはヒドロキシル官能基と結合しているカルボキシル官能基を含有しうる。スペーサ分子の選択の場合には短い鎖長が重要である。それというのも疎水性基が大きすぎると、固相反応物およびスペーサからなる錯体はもはや十分に水溶性ではないからである。

【0020】差当り、水溶液から製造できない固相反応物の本発明によらない最密充填の単分子層を記載する。かかる層は、ベイン（Bain）およびホワイトサイズ（Whitesides）（Angew. Chem., 第101巻（1989年）、第522頁~第528頁）の研究により、ヒドロキシルまたはアミノ末端基を有する脂質を活性化ビオチン誘導体と反応させると得られ、その際出発物質として11-ヒドロキシ-1-デカ-1-チオールの使用下に次式で示されるビオチニル化アルカンチオールが生成する：

【0021】

【化2】



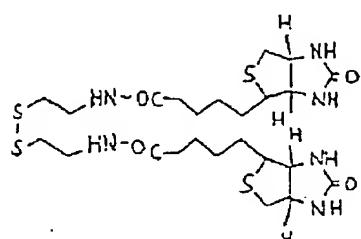
【0022】金表面を有する担体物質にこのアルカンチオールを飽和するまで吸着する場合、厚さの測定によればビオチンに関して100%の被覆を有する最密充填の単分子層が生成する。こうして、そのものとしては本発明によらずかつ遊離反応成分（この場合にはストレプトアビシン）に対し僅かな結合力しか有しない剛体の結合マトリックスが得られる。

【0023】これとは異なり、本発明による結合マトリックスの製造は、固相反応物の2以上の分子、とくに2分子と同時に結合しているスペーサ分子の使用によって可能である。かかるスペーサ分子の1例はシスタミンであり、このものは固定基として1つのジルスフィド基および結合基として2つのアミノ官能基を含有し、従って活性化ビオチンの2分子と結合することができ、その際

次式で示されるビオチニル化化合物が生成する：

【0024】

【化3】

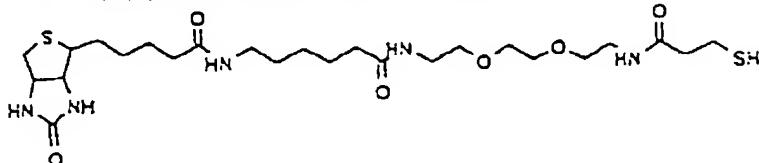


【0025】このビオチニル化化合物は、金表面に吸着する際、ビオチンに関して30%の被覆度を有する本発明による結合マトリックスを構成し、該マトリックスは高い親和力を有する遊離反応成分（ストレプトアビジ

ン)を最密充填膜に結合することができる。

【0026】とくに、スペーサ分子と固相反応物の間に親水性のリンカー基が存在する。このリンカーは、殊に4~15原子の鎖長を有する直鎖状分子であり、その際リンカーの連鎖はとくにC原子とヘテロ原子(とくにN原子およびO原子)から構成されている。この場合、1つまたは幾つか、とくに1~5個の親水性エチレンオキシド単位を含有するリンカー基がとくに望ましい。とくに望ましくは、親水性リンカー基はアミノまたはヒドロキシル成端ポリエチレンオキシドによって形成される。

【0027】親水性リンカーと固相反応物の間には、と\*



【0030】結合マトリックスを製造するための水性反応溶液は、上記の固相反応物のほかにもう1つの親水性希釈分子、つまり固定基を備え、固相反応物が結合していない分子を含有する。適当な希釈分子は固定基およびスペーサ成分ならびに場合により1つのリンカー基を含有し、その際スペーサ分子のC原子数はとくに1~6、とくに望ましくは1~4、最も望ましくは1~3である。この場合でも、スペーサ分子の選択の際には、短かい鎖長が望ましい。それというのも疎水性基が大きすぎると希釈分子はもはや十分に水溶性でないからである。

【0031】固相反応物の代りに、とくに希釈分子の固定基から離れた末端に、親水性官能基、たとえばヒドロキシル基、カルボン酸基、カルボン酸エチルエステル基またはメチルエステル基、カルボン酸アミド基、1個または2個のメチル基またはエチル基で置換されたカルボン酸アミド基、スルホン酸基またはスルホンアミド基が存在する。同様に、希釈分子の固定基から離れた末端に親水性リンカー(上記定義による)または親水性リンカーの一部を結合するのが望ましい。従って、望ましい希釈分子は、スペーサ分子の一方の側に、担体物質と反応性の固定基を含有し、他方の側に親水性末端基を含有する。

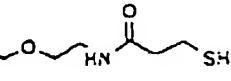
【0032】希釈分子の全特性は、水または水性緩衝液に可溶である程度に親水性でなければならない。さらに、結合分子は担体物質に自然に付加できなければならない。意外にも、希釈分子は、固相反応物と結合しているスペーサ/リンカーよりも著しく短かい鎖長を有する必要のあることが判明した。たとえば、固相反応物に結合したスペーサ/リンカーの鎖長の50%よりも小さい希釈分子は、むしろ、固相反応物におけるスペーサ/リンカーの鎖長に一致する鎖長を有する希釈分子よりもなお良好な結果を生じる。

\*くに、式:  $(CH_2)_n$  (ここでnは2~12、とくに2~8の自然数である)で示されるアルキレン基および結合基からなるもう1つのスペーサ分子を組み込むことができる。

【0028】固相反応物のとくに適當なリンカーとしては、1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタンが判明した。それで、 $C_3$ -チオールスペーサ分子とビオチンスペーサ分子の間に1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタンを組み込むことによって次式で示されるビオチニル化化合物が生成する:

【0029】

【化4】



【0033】従って、希釈分子は、とくに一般式:

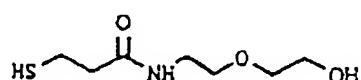
20  $X^1-S-S-X^2$  または  $HS-X^3$   
[式中  $X^1$ ,  $X^2$  および  $X^3$  はそれぞれ  $(CH_2)_n-CO-NH-L-Y$  を表わし、ここでnは1~6の自然数を表わし、Lは4~15原子の鎖長を有する親水性のリンカー基であり、Yは親水性末端基、とくに  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-COOH$  または  $-SO_3H$  である] で示される新規化合物である。

【0034】本発明による結合マトリックスの構成のためには、上記化合物の数種からなる混合物を使用することもできる。

30 【0035】短かい親水性希釈分子のとくに望ましい1つの例は、2-メルカプトプロピオン酸-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)]-エチルアミドである。

【0036】

【化5】



【0037】本発明のもう1つの実施形においては、固相反応物を有するスペーサと固相反応物を有しないスペーサが共有結合によって結合されていてよい。金または銀表面を使用する場合には、この結合はとくにジスルフィド架橋を介して行なわれる。

【0038】希釈分子(固相反応物なしのスペーサ分子)および固相反応物を有するスペーサ分子からなるかかる混合单分子層においては固相反応物を有するスペーサ分子の割合は有利には0.1~90モル%、とくに0.5~70モル%、とくに望ましくは1~40モル%である。

50 【0039】固相反応物は、とくにビオチンまたはビオ

チン類似分子、たとえばデスチオビオチン、イミノビオチンまたはHABA（4-ヒドロキシフェニルーアゾ安息香酸）であり、これらは同様にストレプトアビジン、アビジンまたはその誘導体と反応する。

【0040】本発明による結合膜の1つの特別な態様は、固相反応物として、デスピオチンのようにストレプトアビジンに対し著しく小さい結合力を有するビオチン誘導体を使用する方法である。これらの固相反応物を使用する場合、結合されたストレプトアビジンを、通常のビオチンを含有する溶液の添加によって置換することが可能があるので、普遍結合膜はこうして再使用可能になる。

【0041】しかし、適當な固相反応物のもう1つの例は、抗体と結合しうる抗原またはハプテンである。この場合には、固相反応物はとくに100～1200の分子量を有するハプテンである。適當なのは、たとえばステロイド（たとえばジゴキシン、ジゴキシゲニン、コルチゾール、エストリオール、エストラジオール、チオフィリン、ジフェニルヒダントイン、テストステロン、胆汁酸、プロゲステロンおよびアルドステロン）；短鎖ペプチド（たとえばアルギプレシン、オキシトシンおよびブラジキニン）；フルオレセインおよびその誘導体；T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、アフラトキシン、アトラジン、植物ホルモン、たとえばジベレリン；およびアルカロイド（たとえばセルピンおよびアジマリシン）である。

【0042】とくに望ましくは、ハプテンとしてビオチンおよびビオチン誘導体、ジゴキシン、ジゴキシゲニン、フルオレセインおよび誘導体ならびにテオフィリンが使用される。

【0043】他面において、固相反応物は幾つかの成分からなっていてもよい。これは殊に、固相反応物の内側成分がスペーサ分子と共有結合で結合され、固相反応物の外側成分には共有結合で結合されていないことを表わす。その際、固相反応物の外側成分は、遊離の反応成分を結合することができる。たとえば、内側成分がビオチンであり、外側成分がストレプトアビジンであってもよい。かかる結合マトリックスは同様に、ビオチニル化反応成分（たとえばビオチニル化抗体）を溶液から結合することができる。それというのもストレプトアビジンはビオチンに対し4つの結合部位を有し、そのうちの少なくとも2つはなおあいているからである。

【0044】2成分からなる固相反応物を含有する結合層は、固相反応物の外側、つまり遊離反応成分と結合しうる成分（即ち特殊な場合にはストレプトアビジン）が結合マトリックスの表面に希薄層を形成するときには、本発明による結合マトリックスである。

【0045】希薄な結合性固相反応物のこの本発明による原理は、ビオチン・ストレプトアビジンの結合から他の結合組、たとえば抗体・抗原等に拡張することができる。

【0046】結合マトリックスの表面における固相反応物の被覆度は、結合層の厚さの測定によって決めることができる。その際、測定される層厚は結合層の被覆度につれて減少する。

【0047】本発明による結合マトリックスの異なる種類に基づき、製造方法も細部が異なる。この製造方法の1つの望ましい別法は実施例に示されている。一般に、本発明による方法は担体物質と、本発明による結合マトリックスの結合層を形成する分子が存在する水性反応溶液とのインキュベーションを内容としている。これらの分子は、相対する側に固定基および固相反応物を含有し、その際、上述したように、結合層のすべての分子が固相反応物と結合してはいない。とくに、固相反応物は1つのスペーサ分子を介して固定基と結合している。本発明による結合マトリックスの形成下に溶液から担体物質への固定基の付加は自発工程である。

【0048】第1結合層製造のための担体物質と反応溶液とのインキュベーションは、とくに保護ガス下、水または水性緩衝液中で、有機溶剤および洗剤のような妨害物質の添加なしに行なわれる。

【0049】場合により、殊に固相反応物が幾つかの非共有結合で互いに結合している成分からなる場合、第2工程で第2の反応溶液と共にインキュベートすることにより、別の物質を付加することができる。第2の、場合により別の層を設けるための反応条件は臨界的ではないので、保護ガスなしで作業することができる。

【0050】従って、本発明のもう1つの対象は、担体物質への固定基を備える固相反応物の吸着後、得られる結合マトリックスを、非共有結合で結合している幾つかの成分からなる固相反応物をつくるために、結合マトリックスと結合しうる1つまたは幾つかの別の物質と共にインキュベートする方法である。

【0051】本発明方法により製造した横の結合層は、たとえば表面プラズモン鏡検法によって立証可能であるよう、微視的に均一である（B. RothenhaeuslerおよびW. Knoll, "Surface Plasmon Microscopy", Nature, 第332巻, 6165号, 第615頁～第617頁（1988年）；W. Hickel, B. RothenhaeuslerおよびW. Knoll, "Surface Plasmon Microscopic Characterisation of external surfaces", J. Appl. Phys., (1989年), 第4832頁～第4836頁；W. Hickel, W. Knoll, "Surface Plasmon Optical Characterisation of liquidmonolayers at 5 μm lateral resolution", J. Appl. Phys., 第67巻（1990年）, 第3572頁以降）。5 μmの解像の場合、厚

さの相違は測定できない。

【0052】さらに、本発明は、少なくとも2つの生物親和性反応物 (bioaffinen Reaktanden) (そのうちの1つは固相に結合して存在し、他方の成分は遊離である) の間の特異的結合反応により試料溶液中の被検体を定量するため、本発明による結合マトリックスの成分である固相反応物を使用する方法に関する。

【0053】このような方法では、固相反応物における遊離反応成分の結合の検出は、遊離反応成分が標識基を有することによって可能にすることができる。殊に、酵素または蛍光成分または発光成分による標識付けが慣用である。これにより可能となる、結合の間接的光学的観察は、正確な定量的検出が可能である。

【0054】原則的に、結合は光学的、電気化学的に、実熱量変化または質量形成によって測定することができる。電気化学的技術には殊に、たとえば“バイオセンサーズ (Biosensors)” (Turner, Karube, Wilson (編集)、Oxford Press 出版 (1987年) またはベルグフェルド (Bergveld) 著“バイオセンサーズ・アンド・バイオエレクトロニクス (Biosensors & Bioelectronics)” 第6巻、第55頁～第72頁 (1991年) に記載されているような電位差測定および電流滴定 (Ampereometry) 法が挙げられる。導電率または容量変化による測定も、電気化学的技術として同様に可能である。

【0055】しかし、とくに結合の検出は光学的、殊に反射光学的技術により行なわれ、この技術では担体固定の反応物を有する極めて薄い層の層厚は遊離結合成分の結合によって観察することができる。これらの技術の観察はサドフスキイ (Sadowski) : “レビュー・オブ・オプティカル・メソーズ・イン・インムノセンシング (Review of optical methods in immunosensing)”, SPIE, 第954巻, Optical testing and Metrology II (1988年), 第413頁～第419頁に記載されている。

【0056】とくに望ましい反射光学的方法は表面プラズモン共鳴 (Oberflächenplasmonenresonanz) による結合の検出である。この方法では、分析素子は、透明な誘電材料上に極めて小さい層厚で、固相反応物を有する金属導電層を設けてなる。この分析素子はしばしば光学的免疫センサーとも呼ばれる。かかる光学的免疫センサーの例は、ヨーロッパ公開特許 (EP-A) 第276142号、同第276142号および同第254575号に記載されている。し

かし、固相における結合の定量的検出にとくに望ましいのは、ドイツ国特許 (DE) 第4024476号に詳細に開示されている免疫センサーである。

【0057】上記に記載したように、遊離の反応成分に比べて比較的小さい結合力を有する固相反応物を使用することができる。この場合には、固相に結合した反応成分を、大きい結合力を有する別の遊離反応物の添加によって分離し、それと共に結合マトリックスを再生することが可能である。

【0058】とくに望ましくは、再生可能な結合マトリックスに対し、たとえばデスチオビオチンおよびイミノビオチンのようなビオチン誘導体を、ストレプトアビジンに対し、固相反応物としてのビオチンよりも小さい結合親和力に基づき、使用することができる。(デスチオビオチン/ストレプトアビジンの結合定数は  $10^{12}$  であり、ビオチン/ストレプトアビジンの結合定数は  $10^{15}$  である)。従って、小さい親和力を有する固相反応物を使用する場合、結合したストレプトアビジンを、高親和性反応物 (たとえばビオチン) を含有する溶液の添加によって除去することが可能であるので、こうして普遍結合膜を繰返し使用することができる。

【0059】再生可能のデスチオビオチニーまたはイミノビオチン結合相の使用下に免疫検定の実施には、デスチオビオチニル化またはイミノビオチニル化抗体または抗体フラグメントまたはデスチオビオチニル化またはイミノビオチニル化 (ポリー) ハプテンを使用するのが有利である。

【0060】本発明のもう1つの対象は、被検体測定実施後に結合マトリックスを、固相反応物に結合した遊離の反応成分を別の遊離反応物の添加によって結合マトリックスから分離することにより再生することを特徴とする方法である。その際、別の遊離反応物は固相反応物としての反応成分よりも高い親和力を有するのが有利である。固相反応物と遊離反応物からなる適当な組の例は、たとえばデスチオビオチンとビオチン、または相應に、化学的に極めて僅かに相違し、従って抗体に対して若干異なる結合力を有する2つのハプテンである。

【0061】従って、本発明により製造された結合マトリックスは再生可能な層として使用することもできる。

【0062】さらに、本発明を図1～3と結合して次の実施例により明らかにする。

### 【0063】

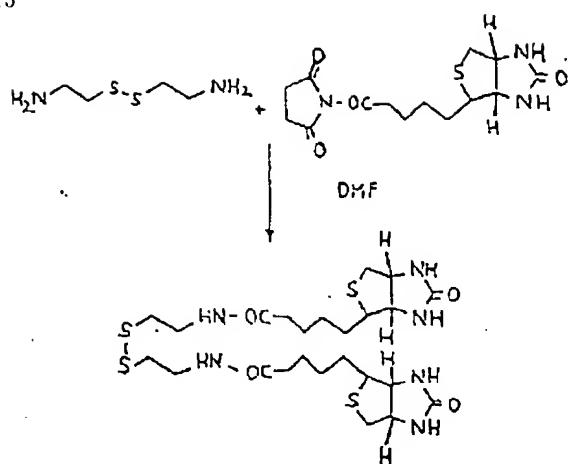
#### 【実施例】

##### 例1

ビスピオチノイルシスタミンの合成

### 【0064】

#### 【化6】



【0065】ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを、ジメチルホルムアミド(DMF)中のシステムニウムジクロリドおよびトリエチルアミンの溶液に加えた。反応混合物を夜どおし室温で攪拌した。反応終了後、生じた沈殿物を濾取し、油ポンプで乾燥し、アセトンから再結晶した。自然化合物は40%の収率で得られた。

#### 【0066】例2：

本発明による単分子層の層厚の測定

図1は、固相への遊離反応成分の結合を反射光学的に測定するための測定装置を略示する。

【0067】修正クレッチュマン(Kretschmann)装置(図1)中に取付けて、被覆した試料を空気ならびに水性媒体に対して調べることができる。

【0068】この反射光学的測定装置はレーザー10を含有する。レーザーから発する一次光線は、試験部分20の表面の法線に対し角度θで入射する。反射光は、集光レンズ12により像面内に配置されたダイオード13上に結像される。

【0069】この測定装置は、さらにクレッチュマン装置のプリズム16および試験溶液の入口および出口15を有する流動クベット14を含有する。

【0070】試験部分20は、クレッチュマン装置のプリズム16、光学的に透明な誘電担体層22および担体層22上に蒸着されている薄い金属層23a, 23bからなる。指標液21の薄層は、プリズム16を光学的屈折なしに光学的に透明な担体層22と結合する。それというのも該薄層はこれら双方の部品と同じ屈折率を有するからである。本例の場合、23aは上述したクロム層であり、23bは蒸着した金層である。25は固定基を介して金表面への固相反応物26の結合を媒介するスペーサ分子である。27は、固相反応物と結合可能であつて固相28中に存在する遊離反応成分である。

【0071】フレネルの式を用いて界面における反射を計算し、PSP分光にデータを適合することができ、その際各層の“光学的厚さ(optischen Dic-

ke)” (=n × d, n=屈折率、d=厚さ) が得られる。

#### 【0072】例3

1-tert. プチルオキシカルボニル-1, 8-ジアミノ-3, 6-ジオキサオクタン(mono-BOC-DADO O)の合成

ジオキサン/水(1/1 v/v)900ml中の1, 8-ジアミノ-3, 6-ジオキサオクタン(DADO O)142g(1モル)の溶液に、攪拌下徐々に、ジオキサン450ml中のジ-tert. プチルカーボネート109g(0.5モル)の溶液を加える。添加後、混合物をなお1.5h、20°Cで攪拌し、引き続き溶媒を留去し、残留物を酢酸エチル/水(1/1 v/v)1lにとる。水相を分離した後、有機相を0.1N HCl 100ml宛で2回抽出する。水相を合し、pH値を希カセイソーダでpH9~10に調節し、溶液をバーホレーター中で液・液抽出する。酢酸エチル750mlで8時間抽出した後、溶剤を除去し、残留物を高度真空で乾燥する。

【0073】収率: 32g (26%)

DC: Kieselgel 60

溶離剤: 酢酸ブチル/水/水酸化アンモニウム=30/15/15

Rf = 0.45

例4

40 1-(ビオチン-アミノカプロン酸)-(1, 8-ジアミノ-4, 6-ジオキサオクタン)-アミド、(ビオチン-X-DADOO)の合成

ジオキサン10mlおよびリン酸カリウム緩衝液0.1モル/l(pH8.5)10ml中のD-ビオチノイル-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(Boehringer Mannheim, Best Nr. 1003933)0.9g(2mモル)およびmono-BOC-DADOO 0.5g(2mモル)の溶液を、20°Cで約2時間攪拌する。反応終了後(DC制御: Kieselgel 60, 溶離剤 酢酸

50

エチル／メタノール=3/7, R<sub>f</sub>=0.6)、溶剤を真空中で蒸発し去り、残留物にトリフルオロ酢酸1mlを加える。BOC基が完全に脱離するまで約30分攪拌する。引き続き、トリフルオロ酢酸を真空中で蒸発したり、残留物に酢酸エチル5mlを加え、不溶物を濾去し、濾液を蒸発乾涸する。

【0074】収率: 0.96g (98%)

DC: Kieselgel 60, 溶離剤 酢酸エチル／メタノール=2:8, R<sub>f</sub>=0.2

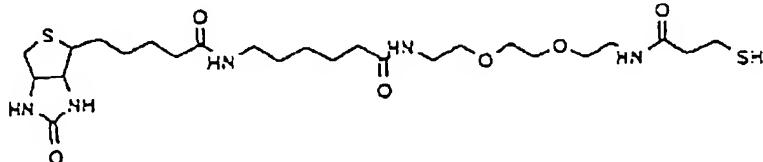
#### 例5

S-アセチルメルカプトプロピオン酸の合成  
メルカプトプロピオン酸10.6g (100mモル)  
に、20°Cで徐々に、塩化アセチル8.6g (110mモル)を滴加する。添加終了後、10分間100°Cに加热する。反応混合物を真空蒸留にかけ、生成物は0.4バール、105°Cで純粋に得られる。

【0075】収率: 5.8g (36%)

1H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2.3  
(s, 3H), 2.7 (t, 2H), 3.1 (t, 2H)

#### 例6



【0078】ビオチン-X-DADOO (例4から)

0.96g (2mモル) およびSATP (例6から)  
0.5g (2mモル) からなる溶液を、ジオキサン20ml およびリン酸カリウム緩衝液0.1モル/1 (pH 8.5) 20ml 中で20°Cで2時間攪拌する。引き続き、溶液を蒸発乾涸し、残留物をトリフルオロ酢酸2ml にとり、不活性ガス下20°Cで0.5時間攪拌する。  
精製はシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (溶離剤: 酢酸エチル/メタノール=3:7) によって行なう。

【0079】収率: 150mg (13%)

DC: Kieselgel 60, 酢酸エチル/メタノール=3/7

R<sub>f</sub>=0.35

#### 例8

ビオチニアミド-3, 6-ジオキサオクチル-S-アセチルメルカプトプロピオン酸アミド、(ビオチン-DADOO-SATP) の合成

リン酸カリウム緩衝液0.1モル/1 (pH 7.0) 40ml に溶かしたビオチン-DADOO 1g (2.7mモル) に、ジオキサン40ml 中のSATP (例6から) 1.4g (5.35mモル) からなる溶液を徐々に加える。添加の間、pH値は、リン酸カリウム緩衝液

\* N-スクシンイミド-S-アセチルチオプロピオネート、(SATP) の合成

S-アセチルメルカプトプロピオン酸16.2g (0.1mモル)、N-ヒドロキシスクシンイミド12.7g (0.11モル) およびジシクロヘキシルカルボジイミド22.7g (0.11モル) を、無水酢酸エチル0.4l 中で20°Cで16時間攪拌する。析出した沈殿物を濾別し、濾液を真空中で蒸発濃縮する。油状残留物を少量の酢酸エチルにとり、冷却する。その際、さらに沈殿物が析出し、これを捨てる。この工程を2回繰返す。最後の濾液から、蒸発濃縮した後にSATP 13g (50%) が得られる。

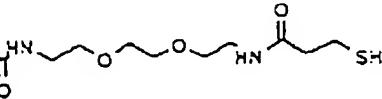
【0076】1H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2.3 (s, 3H), 2.8 (s, 4H), 2.9 (m, 2H), 3.1 (m, 2H)

#### 例7

ビオチニアミノカプロン酸-アミドジオキサオクチルメルカプトプロピオン酸アミド (化合物1)

【0077】

#### 【化7】



0.1モル/1 で連続的にpH 7.0に調整しなければならない。添加終了後、なお10分攪拌し、引き続き蒸発乾涸する。粗生成物はさらに精製せずに次の工程において使用することができる。

【0080】DC: Kieselgel 60, 溶離剤 酢酸エチル/メタノール=3.5/7.5

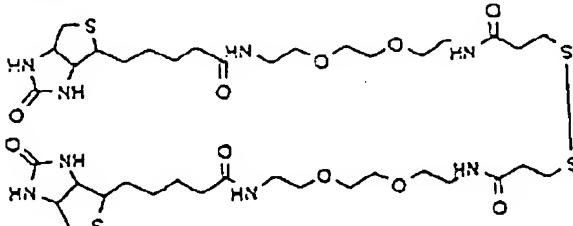
R<sub>f</sub>=0.35

#### 例9

ビースー (ビオチニアミド-3, 6-ジオキサアセチルメルカプトプロピオン酸アミドジスルフィド (化合物2) の合成

【0081】

#### 【化8】



【0082】例8からの粗生成物 1.6g を窒素飽和のリン酸カリウム緩衝液0.5モル/1 (pH 7.5) 100ml に溶かし、メタノール性ヒドロキシルアミン溶

50

液1モル／1 5. 4mlを加える。20℃で2時間攪拌し、引き続き真空中で蒸発乾涸し、シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー（酢酸エチル／メタノール=3/7）により精製する。

【0083】収率：150mg (6%)

DC : Kieselgel 60, 溶離剤 酢酸エチル／メタノール=3/7

R<sub>f</sub> = 0. 35

#### 例10

ビオチンアミド-3, 6-ジオキサオクチル-S-アセチルメルカプト酢酸アミド、(ビオチン-DADOO-SATA) の合成

製造は、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート (SATA) (Boehringer, Best Nr. 1081765) 187mg (0. 8mモル) およびビオチンDADOO 300mg (0. 8mモル) から例8類似に行なう。

【0084】収率：109mg (49%)

DC : Kieselgel 60, 溶離剤 酢酸エチル／メタノール=6. 5/3. 5

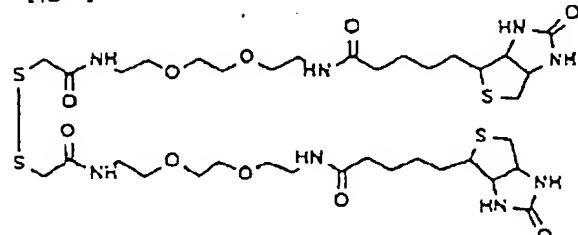
R<sub>f</sub> = 0. 35

#### 例11

ビス-(ビオチンアミド-3, 6-ジオキサセチル)-メルカプト酢酸アミドジスルフィド (化合物3) の合成

【0085】

#### 【化9】



【0086】製造はビオチン-DADOO-SATA 100mg (0. 2mモル) およびメタノール性ヒドロキシルアミン溶液1モル／1 0. 25mlから、例9類似に行なう。

【0087】収率：55mg (60%)

DC : Kieselgel 60, 溶離剤 酢酸エチル／メタノール=3/7

R<sub>f</sub> = 0. 35

#### 例12

a) 2-(S-アセチル) メルカプトプロピオン酸-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)]-エチルアミド THF 25ml中の2-(2-アミノエトキシ)-エタノール2. 14g (20mモル) からなる溶液に、15分内に、THF 50ml中のN-スクシンイミジル-S-アセチルチオプロピオネート (SATP, 例2c) 5g (20mモル) からなる溶液を滴加し、20℃で2時

間攪拌する。反応終結後 (DC制御) 、反応混合物を真空中で蒸発濃縮し、シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィーにかける (Kieselgel 60, 溶離剤 酢酸エチル／メタノール=7/3+1%酢酸)

DC : (Kieselgel 60, 溶離剤 酢酸エチル／メタノール=7/3+1%酢酸)

R<sub>f</sub> = 0. 67

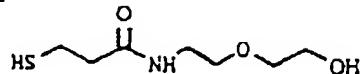
収率：2. 7g

MS (pos FAB) : MH<sup>+</sup> = 236

b) 2-メルカプトプロピオン酸-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)]-エチルアミド (化合物4)

【0088】

#### 【化10】



【0089】化合物 a) 2. 7g (8. 7mモル) に、メタノール中のヒドロキシルアミン溶液1モル／1 600mlを加え、20℃で1時間攪拌した。引き続き、溶剤を真空中で留去し、残留物をジクロロメタンで3回抽出した。油状粗生成物1. 5g が得られ、これをシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した (Kieselgel 60, 溶離剤 ジクロロメタン／メタノール=9. 3/0. 7)

DC : (Kieselgel 60, 溶離剤 ジクロロメタン／メタノール=9/1)

R<sub>f</sub> = 0. 45

収率：0. 86 (無色油状物)

30 MS (pos FAB) : MH<sup>+</sup> = 194

#### 例13

a) 試料調製：金基板は、LAS FN9からなる載せガラス (Berliner Glass KG) にAu (99. 99%) 約5nmを蒸着することによって製造した。

【0090】蒸着は、Balzers社の蒸着装置BAE 250中で行ない、圧力 $\leq 5 \times 10^{-6}$  mバールで実施した。

【0091】b) 単分子層形成：金基板を、蒸着装置を開けた直後、アルゴン保護ガス下に、水 (Milli Q) 中の化合物の0. 5mモル溶液中に入れた。6hの吸着時間後に、基板を水300mlで洗浄し、窒素気流中で乾燥した。

【0092】c) 特性決定：単分子層の特性決定は、表面プラズモン分光分析および接触角測定法を用いて行った。

【0093】表面プラズモン分光分析は、表面および薄膜の特性決定するための高い感度を有する光学的方法であって、特殊な分子標識（たとえば蛍光標識）も必要としない (W. Knoll, MRS Bulletin,

第16巻、No. 7(1991年)第29頁～第39頁。

【0094】自己集合性単分子層(SAM)の層厚の測定のために、空気および水性媒体に対する測定を実施した。

【0095】接触角測定は、界面を分析するためしばしば利用される方法である。その際、基板、被膜の種類および組成および膜上の秩序に関する情報を得ることができる(A. Ullmann, "Introduction to ultrathin organic films", Academic Press, Inc. 1\*

第1表:

#### 測定結果: 測定された層厚および接触角

	SAMの厚さd [Å]				
	d測定値 <sup>1</sup>	d計算値 <sup>2</sup> (垂直)	d計算値 <sup>2</sup> (30° 傾斜)	n <sup>4</sup>	θa <sup>3</sup> [°]
化合物4(水から)	9±2	13	11	1.50	26±2
化合物1(水から)	33±2	38	33	1.50	35±2
化合物1(緩衝液から)	33±2	38	33	1.50	

<sup>1</sup>リン酸塩緩衝液0.05モル/l、pH7.0

<sup>2</sup>SAMの厚さは結合の長さから計算

<sup>3</sup>θa[°]は、A. Ullmann, "Introduction to ultrathin Organic films", Academic Press, Inc. 1991年により測定

<sup>4</sup>屈折率nはUllmann, supraによる

【0098】測定された厚さは、理論的に計算した値と良く一致する。これは、それぞれ整列し、密に充填された単分子層であることを指示する。その際、分子はホワイトサイズ(Whitesides)等(C. D. Bain, G. M. Whitesides, Science 240(1988年)第62頁; K. L. Prime, G. M. Whitesides, Science 252(1991年)第1164頁)により発表されたデータと類似に、長鎖アルカンチオールに関しては同様に表面の法線に対して約30°傾斜していてもよい。

【0099】接触角も、多結晶性Au上のOHないしはビオチン成端アルカンチオールから得られた値と良く一致する(H. Wolf, Diplomarbeit Universität Mainz 1991年)。

接触角は、整列され、密に充填された単分子層のイメージを支持する。

【0100】これら新規の化合物類のストレプトアビジン(SA)の結合力を調べるために、純化合物1のほかに化合物4との混合物も調べた。同様に、さらにタンパク質層を、HCGに対するモノクローナル抗体のビオチニル化Fabフラグメント(Fab<HCG>)およびHCGの吸着によって累積した。

【0101】ストレプトアビジンおよびFabは5×10<sup>-7</sup>モル/l溶液として添加し、HCG(ヒトコリオゴナドトロピン)はNaCl 0.5モル/l中の25μg/ml溶液として添加した。

【0102】

【表2】

第2表:

## 測定された接触角θ a および層厚d[Å]

X b <sup>1</sup>	θ [°] <sup>2</sup>	d(SAM) <sup>3</sup>	d(SA) <sup>3,7</sup>	d(B-Fab) <sup>4,7</sup>	d(HCG) <sup>7</sup>	d(RSA) <sup>5,7</sup>
0	26±2	9	0	0		0
0.1	37±2	10	40	31	16	
0.25	40±2	20	41	26	14	
0.50	39±2	24	36	23	12	
0.75	39±2	28	31	10	4	
1.00	35±2	33	23	7	5	

<sup>1</sup>化合物1のモル分率<sup>2</sup>θ a [°]はUllmann、supraにより測定<sup>3</sup>SA=ストレプトアビジン<sup>4</sup>B-Fab=ビオチニル化Fab< HCG ><sup>5</sup>化合物1および4による金表面の被覆が不十分な場合、ウシの血清アルブミン(RSA)添加によって、金表面の露呈個所におけるタンパク質の吸着、ひいては層厚増加を行わねばならない。<sup>6</sup>膜の屈折率:n=1.50(Ullmann、supra)<sup>7</sup>膜の屈折率:n=1.45(H.Morgan、D.M.Taylor、C.D'Silva、Thin Solid Films、第209巻(1992年)第122頁)。

【0103】チオール単分子層の厚さd(SAM)の増加は、第1表からの値で修正する。

【0104】化合物4により金表面における化合物1を希釈することによって、ストレプトアビジン結合力の最適化が達成される。

【0105】ストレプトアビジンによる表面の被覆が完全な場合には測定された厚さは40Åであり、従って理論的に期待される値と良く一致する(R.C.Ebersole, M.D.Word, J.A.Miller, J.R.Moran, J.Am.Chem.Soc., 第112巻(1990年)第3239頁~第3241頁; P.C.Weber, D.H.Ohrendorf, J.J.Wendoloski, F.R.Sale mme, Science, 第242巻(1989年), 第85頁)。

【0106】この最適化ストレプトアビジン層はB-Fab< HCG >に対する最適結合相として働き、該層は同様にHCG検出のために使用することができる。

【0107】例14

再生される結合マトリックスの製造

例7に記載したと類似に、デスチオビオチンおよびイミノビオチンをデスチオビオチン-X-DADOOおよびイミノビオチン-X-DADOOとしてSATPに結合

することができる。

【0108】これらの化合物は、結合相が再生可能であるべき場合に、結合マトリックスとして使用することができる。

【0109】再生のためには、固相を室温で10分間、NaCl 0.5モル/1中のビオチン $2 \times 10^{-4}$ モル/1の溶液と共にインキュベートする。引き続き、NaCl 0.5モル/1で2回洗浄する。

【0110】結合相の再生は90%以上(表面プラズモン共鳴により測定)行なわれる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】固相への遊離反応成分の結合を測定することのできる測定装置の略示断面図。

【図2】固相反応物を有する成分と希釈分子の組合せにより製造された結合マトリックスの厚さならびにそれに結合したストレプトアビジン(例12)の厚さ/モル分率線図。

## 【符号の説明】

10 レーザー

11 一次光線

12 集光レンズ

13 ダイオード

14 流動クベット

15 入口および出口  
 16 プリズム  
 17 平面の法線  
 20 試験部分  
 21 指標液  
 22 担体層  
 23a, 23b 薄い金属層  
 25 スペーサ分子  
 26 固相反応物  
 27 遊離反応成分

## \* 28 試験相

曲線 1 : ビオチン単分子層の厚さ

曲線 2 : ビオチンのモル分率Xに依存するストレプトア  
ビジンによる厚さ増加

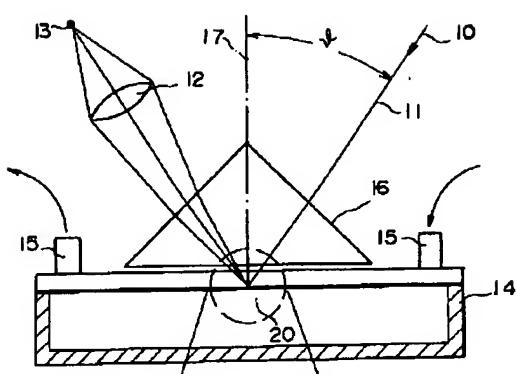
## 【数1】

$$X = \frac{C \text{ ビオチン化合物 } 1}{C \text{ ビオチン化合物 } 1 + \text{ 希釈分子}} : 2$$

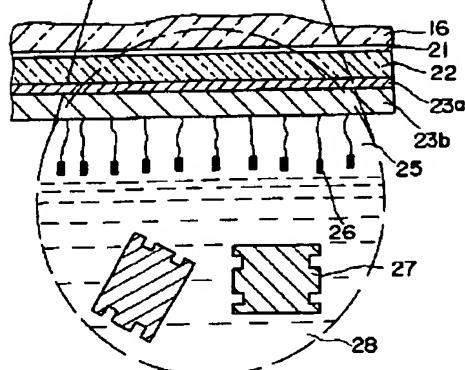
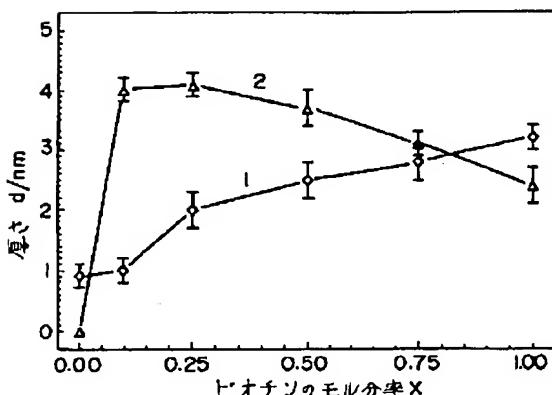
C : モル濃度

\*10

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72) 発明者 クリストファー クライン  
 ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム ブリ  
 ューテンシュトラーセ 16  
 (72) 発明者 マーサ ライリー  
 イギリス国 ロンドン ロンズデイル ロ  
 ード 49 ピー

(72) 発明者 ユルゲン シュピング  
 ドイツ連邦共和国 ケルクハイム-ミュン  
 スター フランクフルター シュトラーセ  
 167  
 (72) 発明者 ヴォルフガング クノル  
 ドイツ連邦共和国 マインツ エルザーブ  
 ラントシュトゥラーム-シュトラーセ 18デ  
 一